

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

E.A.P. DE ODONTOLOGÍA

**Actividad antibacteriana del aceite de la cáscara de la
nuez del Anacardium occidentale sobre Streptococcus
mutans. Estudio in vitro**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Carlos José Ponce Contreras

Lima – Perú

2011

JURADO EVALUADOR DE TESIS

PRESIDENTE: Mg. CD. Romel WATANABE VELÁSQUEZ

MIEMBRO: CD. Katia MEDINA CALDERÓN

MIEMBRO: Mg. Blg. Hilda MOROMI NAKATA

DEDICATORIA

A mis padres, hermanos y tío por su amor, ejemplo y confianza.

A mis sobrinos por regalarme felicidad.

A Lucky.

AGRADECIMIENTOS

A la Mg. Hilda Moromi Nakata por su paciencia y colaboración en la elaboración del presente estudio.

A mis profesores por la amabilidad al brindarme sus conocimientos; en especial a los CD. Katia Medina Calderón y Romel Watanabe Velásquez, miembros del Jurado Evaluador, por sus constantes aportes en la finalización del presente trabajo.

Al personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN	14
II.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	16
	2.1 ÁREA DE PROBLEMA	16
	2.2 FORMULACIÓN	16
	2.3 OBJETIVOS	17
	2.3.1 OBJETIVO GENERAL	17
	2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
	2.4 JUSTIFICACIÓN	19
III.	MARCO TEÓRICO	20
	3.1 ANTECEDENTES	20
	3.2 BASES TEÓRICAS	24
	3.2.1 MEDICINA NATURAL	24
	3.2.1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS	24
	3.2.1.2 PLANTAS MEDICINALES	26
	3.2.1.3 INFORMACIÓN CIENTÍFICA	27
	3.2.1.4 USO DE PLANTAS MEDICINALES	29
	3.2.1.5 TOXICIDAD DE LAS PLANTAS	30
	3.2.1.6 MEDICINA NATURAL EN EL PERÚ	31
	3.2.1.7 MEDICINA NATURAL EN ODONTOLOGÍA	32

3.2.2 ANACARDIUM OCCIDENTALE	33
3.2.2.1 FICHA BOTÁNICA	34
3.2.2.2 CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO	35
3.2.2.3 USOS DEL <i>Anacardium occidentale</i>	35
3.2.2.4 USOS MEDICINALES DEL <i>A. occidentale</i>	36
3.2.2.5 TOXICIDAD	38
3.2.2.6 CÁSCARA DE LA NUEZ DEL <i>A. occidentale</i>	39
3.2.2.7 ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ	39
3.2.2.8 USOS MEDICINALES DEL ACEITE	40
3.2.2.9 USOS ODONTOLÓGICOS	41
3.2.2.10 INDUSTRIALIZACIÓN	42
3.2.3 MICROBIOLOGÍA ORAL	43
3.2.3.1 CARIES DENTAL	43
3.2.3.1.1 MICROBIOLOGÍA DE LA CARIES DENTAL	44
3.2.3.1.1.1 <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i>	45
3.2.3.1.1.2 <i>STREPTOCOCCUS MUTANS MUTANS</i>	46
3.2.3.1.2 FACTORES DE VIRULENCIA	47
3.2.3.1.3 FUENTES DE INFECCIÓN	48
3.2.3.1.4 FACTORES DE RIESGO EN LA APARICIÓN DE CARIES DENTAL	49
3.3 HIPÓTESIS	50
3.3.1 HIPÓTESIS GENERAL	50
3.3.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	50

3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	51
3.4.1 CONCEPTUALIZACIÓN DE VARIABLES	51
3.4.1.1 VARIABLE INDEPENDIENTE	51
Aceite de la cáscara de la nuez del <i>Anacardium occidentale</i> .	
3.4.1.2 VARIABLE INDEPENDIENTE	51
Efecto antibacteriano sobre <i>Streptococcus mutans</i> .	
3.4.1.3 COVARIABLE	51
Tipo de cepa de <i>Streptococcus mutans</i> .	
3.4.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	52
 IV. METODOLOGÍA	 53
4.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	53
4.2 MUESTRA	53
4.2.1 TIPO DE MUESTRA	53
4.2.2 UNIDAD DE ANÁLISIS	53
4.3 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS	54
4.3.1 RECOLECCIÓN DE LA NUEZ DEL <i>Anacardium occidentale</i>	54
4.3.2 EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ	54
4.3.2.1 LAVADO DE LA NUEZ <i>Anacardium occidentale</i>	55
4.3.2.2 SECADO Y MOLINADO DE LA NUEZ	55
4.3.2.3 SEPARACIÓN DE LA CÁSCARA	56
4.3.2.4 PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE	56
4.3.3 DILUCIÓN DEL EXTRACTO	58

4.3.4 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	58
4.3.4.1 PACIENTES	58
4.3.4.2 CULTIVO BACTERIANO	58
4.3.5 PROCEDIMIENTO	59
4.3.5.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE PLACA DENTAL	59
4.4 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	60
4.4.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN	60
4.4.2 PRUEBA DE SENSIBILIDAD BACTERIANA	61
4.4.3 LECTURA DE RESULTADOS	62
4.5 ANÁLISIS DE RESULTADOS	62
 V. RESULTADOS	
5.1 Análisis de la actividad antibacteriana de las diferentes concentraciones del aceite de la cáscara de la nuez del <i>Anacardium occidentale</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> .	63
5.2 Relación entre la actividad antibacteriana de los diferentes grados de concentración del aceite de la cáscara de la nuez del <i>Anacardium occidentale</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> .	64
5.3 Comparación entre la actividad antibacteriana del aceite de la cáscara de la nuez del <i>Anacardium occidentale</i> y la del control positivo, sobre dos de cepas de <i>Streptococcus mutans</i> .	66
5.4 Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite de la cáscara de la nuez del <i>Anacardium occidentale</i> sobre dos tipos de cepas de <i>Streptococcus mutans</i> .	69

VI. DISCUSIÓN	70
VII. CONCLUSIONES	74
VIII. BIBLIOGRAFÍA	75
IX. ANEXOS	81
FOTOS	89

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL <i>Anacardium occidentale</i> SOBRE CEPAS DE <i>Streptococcus mutans</i> AISLADAS DE MUESTRAS DE PACIENTES.	63
TABLA 2: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL <i>Anacardium occidentale</i> SOBRE CEPAS DE <i>Streptococcus mutans</i> ADQUIRIDAS DE LA COLECCIÓN ATCC 25175	64
TABLA 3: RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS DIFERENTES GRADOS DE CONCENTRACIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL <i>Anacardium occidentale</i> SOBRE CEPAS DE <i>Streptococcus mutans</i> AISLADAS DE MUESTRAS DE PACIENTES.	65
TABLA 4: RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS DIFERENTES GRADOS DE CONCENTRACIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL <i>Anacardium occidentale</i> SOBRE CEPAS DE <i>Streptococcus mutans</i> ADQUIRIDAS DE LA COLECCIÓN ATCC.	65
TABLA 5: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL <i>Anacardium occidentale</i> Y LA DEL CONTROL POSITIVO SOBRE CEPAS DE <i>Streptococcus mutans</i> AISLADAS DE MUESTRAS DE PACIENTES.	66
TABLA 5.1: COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL <i>Anacardium occidentale</i> Y LA DEL CONTROL POSITIVO SOBRE CEPAS DE <i>Streptococcus mutans</i> AISLADAS DE MUESTRAS DE PACIENTES.	67

TABLA 6: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MENOR Y MAYOR CONCENTRACIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* Y LA DEL CONTROL POSITIVO SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* AISLADAS DE MUESTRAS DE PACIENTES. 67

TABLA 6.1: COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MENOR Y MAYOR CONCENTRACIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* Y LA DEL CONTROL POSITIVO SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* AISLADAS DE MUESTRAS DE PACIENTES. 68

TABLA 7: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MENOR Y MAYOR CONCENTRACIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* Y LA DEL CONTROL POSITIVO SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ADQUIRIDAS DE LA COLECCIÓN ATCC. 68

TABLA 7.1: COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MENOR Y MAYOR CONCENTRACIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* Y LA DEL CONTROL POSITIVO SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ADQUIRIDAS DE LA COLECCIÓN ATCC. 69

TABLA 8: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* SOBRE DOS TIPOS DE CEPAS DE *Streptococcus mutans*. 69

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* del Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* a partir de distintas concentraciones (al 100 %, al 60 %, al 50 %, al 40 % y al 30 %) sobre dos tipos de cepas de *Streptococcus mutans* (cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y aisladas de muestras de pacientes)

La siembra, cultivo y recolección del fruto fue llevada a cabo en la ciudad de Iquitos (Loreto-Perú), la extracción del aceite se realizó mediante la técnica sólido-líquido o Soxhlet, el diluyente del aceite fue el Hidróxido de Sodio al 0.1 N, y el control positivo la Clorhexidina al 0,12 %.

El aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* en todas las concentraciones utilizadas presentó acción antibacteriana mediante el método de difusión *in vitro*, sobre ambos tipos de cepas de *Streptococcus mutans* y tuvo mejor actividad antibacteriana que la Clorhexidina al 0,12 % ($p > 0,05$). No se pudo encontrar diferencias significativas en la acción antibacteriana del aceite a las diversas concentraciones en ambos tipos de cepa, y las cepas de procedencia clínica fueron estadísticamente más sensibles que las cepas ATCC.

I. INTRODUCCIÓN

El *Anacardium occidentale* es un árbol frutal perteneciente a la familia Anacardiaceae, la mayoría de autores la señalan como nativa de Brasil y en general de todo el hemisferio norte de América del Sur. Crece también en distintas zonas de nuestra Selva, donde además se le atribuye propiedades antifúngicas y antibacterianas.

Perteneciente a la familia de las Anacardiaceae, es conocida como Cajueiro en Brasil, Cashew en EE.UU., Marañón en Costa Rica, Ecuador y Perú, y como Merey en Colombia y Venezuela. Su periodo de floración oscila entre los meses de Junio y Julio.

En algunos países de América del Sur se la cultiva como planta medicinal e industrial. Su empleo está orientado a las hojas, corteza, resina, pedúnculo, manzana, la nuez, epicarpio del fruto, raíz y flores.

La manzana, pedúnculo, o "fruto falso" equivale al 90 % del peso total. La nuez o "fruto verdadero" constituye el restante 10 %, con una masa de 3 a 20 g. y una gran demanda a escala mundial gracias a su calidad nutricional, esta nuez está compuesta de tres partes: la cáscara, el tegumento o película y la almendra. El aceite de la cáscara de la nuez es un líquido cáustico de color oscuro y en su composición predomina el ácido oléico (conforma cerca del 75 % de los ácidos grasos presentes).

Estudios realizados indican que este aceite posee propiedades antibacterianas como por ejemplo sobre *H. pylori*; y antifúngicas sobre especie del género *C. albicans*.

A nivel odontológico el aceite es útil al momento de tratar una odontalgia, ya que elabora ácidos anacárdicos y totarol. En forma empírica la aplicación de la esencia debe de ser directa a la lesión,

con la ayuda de una torunda de algodón, y de únicamente una gota del aceite.

El Gabinete de Estudios de Medicina Tradicional en su *Cuaderno de Saúde* señala como odontálgico al *Anacardium occidentale*, pero no especifica que procedimiento seguir y tampoco mencionan si dicha actividad fue o no constatada por el Gabinete.

Se han realizado estudios acerca de la actividad antibacteriana sobre diversos microorganismos que prevalecen en la cavidad oral, con resultados diferentes. Por ello, en la presente investigación se demostrará que el aceite del fruto que crece en nuestro territorio también posee actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*, y que su efecto es mejor al de la Clorhexidina al 0,12 %

II. PROBLEMA DE INVESTIGACION

2.1 ÁREA PROBLEMA

Las plantas, por su biodiversidad y riqueza en metabolitos secundarios, proporcionan una interesante fuente de posibles sustancias activas contra muchas bacterias, y sabiendo que cerca del 25 % de los fármacos tienen principios activos naturales, en los últimos años se ha ido desarrollando un creciente interés en la investigación y búsqueda de efectos antibacterianos de extractos de múltiples especies.

El *Anacardium occidentale* es un fruto que crece en gran parte de la selva de nuestro país. El aceite extraído de la cáscara de su nuez ha sido objeto de estudio en diversas investigaciones, algunas de ellas realizadas a nivel odontológico donde se buscó demostrar su actividad antibacteriana,²⁻¹¹ además la Farmacopea cubana de plantas medicinales destaca la actividad antifúngica y antibacteriana del *Anacardium occidentale*.¹² Por ello el propósito de la realización de esta investigación es demostrar la actividad antibacteriana del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre *Streptococcus mutans*, principal agente etiológico de la caries dental.

2.2 FORMULACIÓN

¿El aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale*, en distintas concentraciones presenta actividad antibacteriana *in vitro* sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC y procedente de muestras de pacientes?

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale*, a partir de distintas concentraciones, sobre dos tipos de cepas de *Streptococcus mutans*.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* al 30 % sobre cada cepa de *Streptococcus mutans*; una obtenida de muestras de pacientes, y otra adquirida de la colección ATCC.

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* al 40 % sobre cada cepa de *Streptococcus mutans*; una obtenida de muestras de pacientes, y otra adquirida de la colección ATCC.

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* al 50 % sobre cada cepa de *Streptococcus mutans*; una obtenida de muestras de pacientes, y otra adquirida de la colección ATCC.

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* al 60 % sobre cada cepa de *Streptococcus mutans*; una obtenida de muestras de pacientes, y otra adquirida de la colección ATCC.

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* al 100 % sobre cada cepa de *Streptococcus mutans*; una obtenida de muestras de pacientes, y otra adquirida de la colección ATCC.

Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* entre cada una de las concentraciones del Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* y el control positivo sobre dos tipos de cepas de *Streptococcus mutans*; una obtenida de muestras de pacientes y otra adquirida de la colección ATCC.

2.4 JUSTIFICACIÓN

Los aceites esenciales de las plantas tienen probadas propiedades antibacterianas, además que casi el 25 % de los fármacos a nivel mundial tienen como principio activo a algún derivado de origen natural. Se estima que por lo menos el 80 % de la población mundial ha utilizado en algún momento la medicina natural, por ello el Organismo Mundial de la Salud promueve su desarrollo. Lamentablemente solo el 1 % de las cerca de 250 000 especies de plantas de interés farmacológico han sido estudiadas debidamente.

La búsqueda de mayor conocimiento sobre la actividad antibacteriana de las plantas en el sector farmacéutico y alimentario, ha despertado el interés para evaluar las propiedades del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale*.

El aceite esencial obtenido de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* es usado empíricamente como un agente antibacteriano y antifúngico por pobladores de gran parte de la selva de nuestro país, región de clima tropical donde mejor desarrollo tiene el fruto. La actividad contra microorganismos que habitan la cavidad oral ha sido reportada previamente, sin embargo son pocos los estudios donde se analiza la acción sobre *Streptococcus mutans*, principal agente etiológico de caries dental, y de ellas ninguna realizada a nivel local.

Determinar la actividad antibacteriana del aceite extraído de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre *Streptococcus mutans* permitirá demostrar científicamente los beneficios del aceite para una futura aplicación clínica, de modo que pueda ser útil en la elaboración de nuevos agentes para la industria farmacéutica, alimentaria u odontológica.

III. MARCO TEORICO

3.1 ANTECEDENTES

Pereira y col. (2006)¹³ evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto del *Anacardium occidentale* sobre *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, y además sobre placa dental. El estudio de la actividad antimicrobiana se realizó sobre un medio sólido mediante un método de difusión, donde se buscó determinar la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) y la Mínima Concentración Inhibitoria de Adherencia (MCIA) Se utilizó Gluconato de Clorhexidina (0,12 %) como control positivo, y los halos de inhibición (MCI) fueron observados en concentraciones de 12,5 µL para *S. mutans* y 6,25 mg/L para *S. mitis* y *S. sanguis*. Los resultados para hallar la MCIA (adherencia) fueron: 0.3mg/L para *S. mutans* y *S. mitis*, y 0,15 mg/L para *S.sanguis*.

Ferreira y col. (2005)¹⁴ estudiaron la actividad antifúngica “*in vitro*” del extracto de la cáscara del *Anacardium occidentale* sobre *Candida albicans*, *C. stellatoidea*, *C. krusei* y *C. tropicalis*; comparándolo con la actividad del Gluconato de Clorhexidina (0,12 %) mediante la determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI). El extracto presentó una potente actividad antifúngica sobre todos los microorganismos ensayados, con una MCI de 1:8 y halos de inhibición que oscilaron entre 12 y 18 mm; para el Gluconato de Clorhexidina (0,12 %) la MCI fue de 1:16, con halos de inhibición de entre 11 y 22 mm.

Melo y col. (2004)¹⁶ analizaron la toxicidad pre clínica aguda del extracto de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* (extracto hidroalcohólico diluido al 70 %) en 20 ratas raza Wistar con

pesos entre 250 y 300 gramos, separados en dos grupos: 5 machos y 5 hembras en cada grupo. Las ratas del primer grupo recibieron suero fisiológico por vía oral, y los del segundo recibieron la máxima dosis permitida legalmente, 5g/kg vía oral. Exámenes bioquímicos realizados no arrojaron alteración a nivel hematológico en ambos grupos, pero si un aumento significativo en los niveles séricos de las transaminasas AST y ALT en los animales del segundo grupo, esto debido a que la dosis administrada fue cerca de 350 veces más de lo usualmente empleado. Se concluyó que el aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* es prácticamente atóxico.

Medina (2003)² evaluó el efecto del calentamiento del líquido de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* en su composición química y en su actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*. Simuló los tratamientos más comunes en la industrialización de la almendra, determinó la actividad antimicrobiana de las muestras, y caracterizó los componentes con mayor actividad antibacteriana. El tratamiento a 92 °C no afecta la actividad antibacteriana, a 150 °C no afecta la actividad bacteriostática pero disminuye la bactericida, y a 200 °C disminuye ambas actividades.

Garzón y col. (2002)³ estudiaron el efecto de formaciones de sales de los componentes activos del líquido de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre *Streptococcus mutans* en solución con hidróxido de Sodio (NaOH) al 0.1 N. Los resultados demostraron una acción superior a la reportada por la Clorhexidina al 0,12 % luego de las primeras 144 horas; se comprobó que el NaOH 0.1 N es óptimo para solubilizar el aceite, permitiendo así su utilización en un medio acuoso sin afectar su actividad bactericida.

Lima y col. (2000)¹⁷ examinaron la actividad antimicrobiana del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre algunos microorganismos en boca: *Streptococcus mutans* ATCC

25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida utilis*. Los ácidos anacárdicos obtenidos a partir de extractos etílicos del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* presentaron actividad antibacteriana contra dichos microorganismos; encontrándose mayor actividad inhibitoria sobre *Streptococcus mutans*, microorganismo, Gram positivo predominante en Caries dental.

Gaitán (2000)⁴ estudió la estructura química de las moléculas que presentan mayor actividad antimicrobiana en el líquido de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale*. Concluyó que la acción antibacteriana depende no sólo del núcleo aromático, sino también del grado de insaturaciones en la cadena alifática sustituyente: a mayor número de insaturaciones, mayor actividad bactericida y bacteriostática de la muestra.

Pinto y col. (1999)⁵ analizaron la actividad antibacteriana del líquido de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, variedad “criollo llanero” corpoica, a partir del extracto crudo en éter de petróleo y cinco fracciones del mismo. Determinaron que el extracto crudo y sus diluciones presentan una acción antimicrobiana superior al de la Clorhexidina (CMI 4,000 ug/mL) se observó que la mayor acción antimicrobiana se logró con 0,312 ug/mL.

Guatibonza (1999)⁶ realizó la extracción del líquido de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale*, lo diluyó hasta obtener varias fracciones, y posteriormente determinó la actividad antibacteriana de cada una de estas sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La capacidad antibacteriana fue distinta para cada fracción.

Muroi y Kubo (1993)¹⁵ analizaron los ácidos anacárdicos aislados del *Anacardium occidentale* Linn (Anacardiaceae) y a una serie de

sus análogos sintéticos, entre ellos el ácido 6-alkylsalicylic; resultando ser este último un potente bactericida sobre *Streptococcus mutans*. La máxima actividad antibacteriana del ácido 6-alkylsalicylic, en contra de esta bacteria cariogénica, se halló en el carbono lateral de una cadena larga compuesta por 12 átomos de carbono. Para mejorar la actividad bactericida de los ácidos anacárdicos se probaron varias combinaciones, donde se encontró que una mejor actividad bactericida sinérgica se da en las combinaciones del anetol o del linalol con el ácido anacárdico /6[8(Z,11(Z),14-pentadecatrienyl] ácido salicílico/.

3.2 BASES TEÓRICAS

3.2.1 MEDICINA NATURAL

Desde hace miles de años las plantas como recurso terapéutico son útiles a los seres humanos de todas las culturas existentes, ya sea para curar o para tratar cualquier enfermedad o dolencia. Se sabe que existen alrededor de 500,000 especies vegetales en nuestro planeta, de los cuales un muy pequeño porcentaje, no mayor al 10 %, es utilizado como alimento tanto por el hombre como por los animales, y un porcentaje ligeramente mayor es utilizado con fines medicinales.¹⁸

Precisamente son estas plantas aquellas que dieron forma a la base de los sistemas tradicionales de medicina desde hace cientos de años, los cuales continúan desarrollando un papel esencial en la salud de todos nosotros.¹⁹

Hipócrates, conocido como el "Padre de la Medicina", hace aproximadamente 2500 años, redactó un listado de cerca de cuatrocientas plantas que presentan algún tipo de propiedad medicinal útil para el ser humano.¹¹ Precisamente es en un Principio hipocrático en el que se basan los enfoques de la dieta medicinal alternativa. Él afirmaba que: "El alimento debe ser nuestra medicina, y la medicina debe de ser nuestro alimento."²⁰

3.2.1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Los productos naturales empleados en el tratamiento de algunos males que aquejan al ser humano nos han acompañado en el transcurrir de los siglos. Desde la Edad Antigua estas plantas y

algunos de sus derivados eran empleados en China, Babilonia y Egipto.

Se estima que el primer texto relacionado a la medicina natural fue redactado aproximadamente el año 3000 a.C.; Este texto fue grabado en arcilla, y en él se agrupó una serie de tabletas con caracteres cuneiformes, donde se describen a algunas plantas, y se mencionan a los autores de dichas notas.²¹

Algunos de los papiros del antiguo Egipto están relacionados a la medicina, en ellos se da cuenta de más de 400 materias primas constituidas principalmente por sustancias de origen animal -tales como sangre, huevo, miel, orina y excrementos- y otro grupo constituido por sustancias vegetales. Uno de los más conocidos es el Papiro de Smith, el cual es una copia de otro que data del período comprendido entre el 2980-2700 a.C. denominado “Papiro quirúrgico”.²²

El compendio titulado *Pen is'ao Kang mou*, publicado en 1597 a.C. expone 8160 fórmulas preparadas principalmente a base de sustancias de origen vegetal,²² el Papiro de Ebers, descubierto en Egipto en 1873 por George M. Ebers, que se cree data de 1502 a.C.; así como algunos de los escritos de Plinio “el Viejo” y Flavio Josefo, ambos autores del Siglo I de nuestra era, mencionan también a las plantas como efectivos agentes medicinales.¹⁸

El rey Marduk-apal-idina II, quien reino Babilonia durante la Dinastía Asiria entre los años 722 y 710 a.C., ordenó la construcción de un jardín para el cultivo de plantas medicinales, las cuales eran rotuladas en tablillas colocadas junto a cada especie, las cuales al ser halladas posteriormente permitieron que la medicina babilónica pueda ser conocida en Occidente.²²

En Grecia, figuras como Aristóteles e Hipócrates describieron la importancia de la medicina herbaria; precisamente es Hipócrates en su obra *Corpus Hippocraticum* quien detalló un remedio específico para cada dolencia, basado fundamentalmente en el uso de plantas. Teofasto de Erasios realizó también estudios botánicos donde se refirió al uso de muchas plantas en el tratamiento de otras tantas enfermedades.²²

Durante el Medioevo, Pedanios Dioscórides en su tratado *De Materia Médica* mencionó cerca de 600 plantas medicinales. Este tratado fue el prototipo en el que se basan las farmacopeas actuales.¹⁸

En la India Antigua, la medicina proponía como objetivo principal el conocimiento de los productos medicinales de origen vegetal.²²

3.2.1.2 PLANTAS MEDICINALES

De acuerdo a la OMS (1979) una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contenga sustancias que puedan ser empleadas con propósitos terapéuticos, o cuyos principios activos puedan servir de precursores en la síntesis de nuevos fármacos.²³ Dichas plantas presentan una propiedad curativa en virtud a los metabolitos que elaboran, y para que éstas nos proporcionen los efectos deseados debemos ingerir sus principios activos, es decir aquellos componentes que contengan un determinado poder curativo.²⁴

Existen plantas medicinales que pueden tomarse directamente consumiéndolas como un alimento más, algunas son hierbas que al mezclarse con los alimentos aportan un peculiar sabor y otorgan al mismo tiempo sus propiedades medicinales; otras pueden utilizarse frescas o secas, en cuyo caso debemos machacarlas para poder espolvorearlas sobre la comida; sin embargo la mayoría debe de

pasar por procesos extras para poder extraer sus principios activos medicinales y así ser absorbidas por nuestro organismo.

Las plantas utilizadas en la medicina natural contienen muchos componentes naturales, al extraerlos se obtienen una mezcla de estos constituyentes, los cuales se purifican mediante diversos procesos químicos. Sin embargo se asegura que en los preparados de la medicina herbaria los elementos bioquímicos tienen mejores efectos al trabajar en grupo que empleándose por separado, y mejor aún trabajando de ese modo se disminuye la toxicidad de los componentes.²⁵

Diversas propiedades terapéuticas en una innumerable cantidad de plantas han sido demostradas científicamente, pero recién en el siglo XIX con el desarrollo de la química y la física se aislaron principios activos de especie vegetal con gran impacto en la medicina.²⁶ Es así que se lograron obtener drogas químicamente puras; las primeras en ser aisladas fueron la morfina y la quinina.

Los aceites extraídos, como el aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale*, son aislados, purificados y cuantificados, para posteriormente ser evaluados en ensayos farmacológicos y finalmente ser convertidos en medicamentos de uso común.²⁴

3.2.1.3 INFORMACIÓN CIENTÍFICA

Desde los sabios del Alto Egipto hasta los druidas místicos de los bosques galos, desde los médicos chinos de hace 5000 años hasta los grandes científicos del siglo XVIII, nunca se abandonó la búsqueda hacia el conocimiento de las plantas y sus virtudes terapéuticas.²¹

Actualmente existe un marcado interés por la llamada medicina alternativa, complementaria, tradicional u holística, tanto por parte de la población como por la de muchos médicos; y ello a pesar que hace un par de décadas los médicos contemporáneos la rechazaban.²⁷ Esto sumado a que en los últimos años, la industria farmacéutica y los equipos de investigadores de numerosos países han vuelto a interesarse por los recursos naturales y por las plantas medicinales.²⁸

Gordon, por ejemplo, menciona que en el National Institute of Health Office of Alternative Medicine de los EE.UU. clasifican a las técnicas de esta especialidad en siete categorías; la medicina verde, llamada fitoterapia, es una de estas especialidades, y consiste en un conjunto de tratamientos terapéuticos basados directamente en el uso de las drogas de origen vegetal.²⁵

Sin embargo es evidente el vacío que existe en la investigación científica hacia esta medicina, puesto que con un más esforzado estudio a los productos que la naturaleza genera se podrían establecer definitivamente las pautas para su adecuado uso y su correcta dosificación en cada caso que se las emplee.²⁹

La extracción de recursos naturales es bien aprovechada por los países desarrollados, los cuales obtienen la fuente de sus investigaciones en la flora natural de países como Brasil, la India o Perú, naciones cuya riqueza viene siendo explotada y lucrada por las patentes y las transnacionales extranjeras.

Se puede afirmar categóricamente que estos recursos están en peligro de extinción, y que lamentablemente aquellos países que poseen una gran diversidad biológica pero que no cuentan con recursos económicos que les permita explotar quizás a su mayor riqueza, resultan ser los más afectados.³⁰

3.2.1.4 USO DE PLANTAS MEDICINALES

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 80% de los habitantes a nivel mundial ha utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud¹, es por ello que realiza esfuerzos para promover y desarrollar el uso racional de la medicina tradicional en todo el mundo; en 1977 fue concebido un programa que introdujo las plantas a la medicina convencional.³¹

Un análisis de las prescripciones presentadas en farmacias de Estados Unidos arrojó en 1998 que alrededor del 25 % contienen extractos de plantas o principios activos derivados de ellas; por otra parte, actualmente en muchos países, no menos de 119 sustancias químicas derivadas de 90 especies pueden ser consideradas de importancia, de ellas el 74 % fueron descubiertas mediante estudios químicos o a través del aislamiento de los principios activos de plantas usadas en la medicina tradicional.¹

En muchos países se ha comprobado el aumento del uso que hace la población de esta medicina. En entrevistas realizadas en los EE.UU., Bélgica, Alemania y Austria se demostró que el 60 % de alemanes y belgas, el 74 % de los británicos, y más del 33 % de la población de los EE.UU, apelan porque se introduzcan estas técnicas en los Sistemas Nacionales de Salud.³²

En Australia, el 80 % de las personas infectadas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) han recurrido a las diversas formas de tratamiento comprendidas en la medicina alternativa.³³

En Jamaica, por lo menos 334 especies de plantas han sido identificadas como poseedoras de propiedades medicinales, 193 de las cuales fueron sometidas a pruebas para determinar su

bioactividad, los extractos crudos de 80 de ellas poseen una bioactividad razonable, y en 44 se identificaron productos naturales.³⁴ En los últimos veinte años las plantas han sido una fuente importante de los medicamentos que se consumen en Gran Bretaña y EE.UU. ello gracias al buen comportamiento que tiene cada uno de sus componentes activos.³⁵

3.2.1.5 TOXICIDAD DE LAS PLANTAS

En la sociedad occidental se han desarrollado investigaciones científicas sobre los efectos biológicos adversos de las plantas en seres humanos, no encontrándose cifras negativas si se sigue un control adecuado en las indicaciones de las mismas.³⁶

Se asegura también que en los preparados de medicina herbaria los elementos bioquímicos al trabajar en grupo tienen un efecto mayor que cuando se emplean por separado, y que además la toxicidad disminuye notablemente.²⁵

Oliviera y col. (2001)³⁷ evaluaron la toxicología de los extractos fluidos de algunas plantas de origen cubano, así como sus vehículos, para comprobar su inocuidad con vistas al uso terapéutico propuesto. Se concluyó, en forma general, que la toxicidad encontrada en las muestras ensayadas se debe a la presencia del alcohol en el vehículo utilizado; no se encontró otro tipo de alteraciones toxicológicas. Finalmente se clasificó a dichos extractos como dañinos no tóxicos.

Beyra y col. (2004)³⁸ realizaron un trabajo de campo en siete comunidades de la provincia de Camagüey - Cuba, sobre el uso popular e indicaciones de plantas medicinales. Se presentó información etnobotánica de 111 especies de plantas pertenecientes a 96 géneros y a 55 familias, y se obtuvieron 173 indicaciones de uso

medicinal. Se desconocía la composición química de 39 de las especies, y de 18 no se encontraron referencias de su utilización en farmacia.

Waizel-Bucay y col. (2007)²⁴ mencionaron que algunas sustancias presentes en algunos vegetales al ser empleadas en odontalgias pueden destruir la pieza dentaria, ocasionar dermatitis u ocasionar envenenamiento, por lo que su uso puede ser desfavorable; sin embargo sólo se presentan con fines informativos y de divulgación científica. Así mismo mencionan que el pericarpio del *Anacardium occidentale* es un peligroso cáustico energético que podría ocasionar dermatitis, ya que contiene alquenilfenoles en su composición.

3.2.1.6 MEDICINA NATURAL EN EL PERÚ

En las primitivas aldeas hubieron quienes desarrollaron un conocimiento más profundo y una mejor adaptación al medio de entonces; ello motivó a la aparición de los primeros chamanes, quienes no solo tenían a su cargo el manejo de los problemas de salud de sus congéneres, sino que podían pronosticar cuáles eran las mejores épocas para el cultivo de las semillas y para la recolección de ellas.³⁹

La población aborígen americana conoció y respetó el medio ambiente, equilibraron sus necesidades y la de los recursos existentes viviendo en armonía, desarrollaron sistemas agrícolas y estrategias para lograr un óptimo aprovechamiento de los recursos naturales, manejaron conocimientos astronómicos relacionando los ciclos del sol y la luna con los procesos de flora y fauna, establecieron calendarios agrícolas con los que podían preparar cultivos y tratar el suelo adecuadamente, e incluso lograron también domesticar especies y seleccionar variedades de ellas; todo ello les

permitió desarrollar sistemas de producción sin llegar a destruir el ecosistema.

Al llegar los españoles y portugueses al continente americano encontraron un gran número de especies cultivadas, plantas semidomesticadas, otras que solamente eran recolectadas, y además plantas muy bien empleadas medicinalmente.²⁹

Esta increíble información sobre la flora medicinal de las grandes culturas americanas -que datan de los viajes de Colón, Vasco da Gama, Magallanes, entre otros- motivó que los reyes de España organizaran expediciones científicas para estudiar esta vegetación recién descubierta y poder así darle utilidad. De esas expediciones destacaron tres: la de México, la de Nueva Granada (Colombia), y la de Perú y Chile; esta última estuvo integrada por Hipólito Ruiz, José Pavón, el botánico José Dombey y los dibujantes José Brunete e Isidro Gálvez.⁴⁰

Durante los periodos de la Independencia y la República arribaron a nuestro país expediciones europeas como las encabezadas por el alemán Alexander von Humboldt, la dirigida por el italiano Antonio Raymondi, o las guiadas por Augusto Weberbauer y Francis Mc Bride. Precisamente fueron ellos quienes, identificados plenamente con nuestro país, estudiaron nuestra flora y fauna de aquella época.⁴¹

3.2.1.7 MEDICINA NATURAL EN ODONTOLOGÍA

Estos últimos años se realizaron numerosos estudios sobre plantas que durante mucho tiempo fueron empleadas para tratar tradicionalmente diversas afecciones a nivel oral; estos estudios demostraron que dichas propiedades medicinales eran

científicamente comprobables, como en el caso de la *Uncaria tomentosa* o "uña de gato" que presenta un efecto antiinflamatorio y favorece la cicatrización de algunas lesiones orales.⁴²⁻⁴⁴ La *Croton lechleri* o "sangre de grado" demostró tener propiedades astringentes y hemostáticas, siendo de gran utilidad en casos de osteomielitis y osteítis.⁴⁵ El *Myroxylon balsamun* o "bálsamo del Perú" posee propiedades regeneradoras de tejidos en casos de alveolitis seca, y que al asociarse con Eugenol elimina el dolor y mal olor presentes en esta patología.⁴⁶ El *Aloe vera* o "sábila" disminuye la cantidad de placa y la inflamación gingival y de garganta.⁴⁷

Smith-Palmer (1998)⁴⁸ presentó un estudio en el que 21 plantas (entre ellas: canela, tomillo y clavo de olor) demostraron tener, sobre todo, propiedades antibacterianas sobre Gram (+) muchos de ellos huéspedes en la cavidad oral.

Waizel-Bucay y col. (2007)²⁴ presentaron 51 especies correspondientes a 29 familias botánicas reportadas como utilizadas en odontalgias; sostuvieron que dichas plantas elaboran metabolitos secundarios con posible actividad biológica, tal como los aceites esenciales. La administración de estas puede ser por vía local, tópica, mediante enjuagues, ingiriéndola como infusión, por cocimiento, o como cataplasmas. Las formas de uso más frecuentemente reportadas son las infusiones y los cocimientos, y de acuerdo a la parte u órgano de la planta empleada, la mayoría de las veces se usa toda la planta fresca, siguiendo en importancia el uso de las hojas, inflorescencias, la corteza o las ramas, el aceite, el látex, y las resinas.

3.2.2 ANACARDIUM OCCIDENTALE

El *Anacardium occidentale* L. es un árbol frutal perteneciente a la familia Anacardiaceae, el cual es originario del litoral Atlántico tropical americano, incluyendo las Antillas; algunos limitan el área al noreste del litoral brasileño.⁴⁹

Para otros autores existen indicios de que su centro de origen se encuentra en la faja costera del Brasil septentrional y nororiental.⁵⁰ Pero la mayoría de autores la señalan como nativa de Brasil y en general de todo el hemisferio norte de América del Sur.

En el siglo XVI los portugueses lo introdujeron en la India y probablemente en África. Es así que las plantaciones y masas espontáneas de mayor tamaño en el mundo se encuentran en África, especialmente en Mozambique y la India.

En algunos países de América del Sur se la cultiva como planta medicinal e industrial, siendo Brasil el mayor exportador a nivel mundial. Crece también en distintas zonas de nuestra Selva, donde además se le atribuye propiedades antifúngicas y antibacterianas.²⁷

3.2.2.1 FICHA BOTÁNICA

La especie *Anacardium occidentale* L. perteneciente a la familia de las Anacardiaceae, es conocida como Cajueiro en Brasil, Cashew en EE.UU., Marañón en Costa Rica, Ecuador y Perú, y como Merey en Colombia y Venezuela. Su periodo de floración oscila entre los meses de Junio y Julio.⁵¹

Se describe como un árbol de 5 a 8 metros, con hojas sencillas, oblongas, coriáceas y alternas de 8 a 12 centímetros de largo y entre

4 a 6 centímetros de ancho. Flores pequeñas unisexuales con cáliz de cinco pétalos, en panículas terminales muy aromáticas.

El color de la flor es blanco cuando se abre por la mañana y se torna rojizo en la tarde; su fruto es una nuez reniforme de 2 a 3 centímetros verde grisácea sostenida por un pedicelo vistoso y carnosos, de color amarillo o anaranjado, muy jugoso cuando madura.⁵¹

3.2.2.2 CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO

La manzana, pedúnculo, o "fruto falso" equivale al 90 % del peso total del Anacardo, es de consistencia carnosa, posee una forma periforme y redondeada, presenta una masa de entre 70 y 100 g. con un pH entre 3,8 a 4,4 y una cierta astringencia o sabor picante debida a su alta concentración de taninos. Presenta un alto contenido en vitamina C, y a escala industrial se elabora a partir de él productos como jugos, néctares, concentrados, compotas, jaleas y dulces.

La nuez o "fruto verdadero", constituye el restante 10 % del peso, con una masa de 3 a 20 g. y una gran demanda a escala mundial gracias a la calidad nutricional de la almendra. Está compuesta de tres partes: la cáscara, el tegumento o película y la almendra.

3.2.2.3 USOS DEL *ANACARDIUM OCCIDENTALE*

En Costa Rica se cultiva como árbol ornamental y frutal, su fruto se consume tostado, y su pedicelo maduro además de consumirse fresco permite la producción de vinagre, vino y conservas.⁵²

McLaughlin y col. (2005)⁵³ mencionan que el pedúnculo del *Anacardium occidentale* se puede conservar enlatado en almibar, que también se puede usar para preparar chutney o pasta de frutas, y que debido a su alto contenido en pectina puede ser industrializados para obtener jaleas.

Este jugo es de fácil fermentación, luego del cual puede ser consumido sin ser nocivo para quien lo beba; en varios países se usa para preparar vinos y licores destilados (por ejemplo en Brasil, Cuba, Guatemala, países de África occidental, India, Sri Lanka y Las Filipinas).

Se utiliza también como colorante, es por ello que se recomienda tener cuidado al manipular el jugo pues podrían manchar sus prendas permanentemente.⁵³

Vit (2003)⁵¹ hace hincapié a la aplicación de los derivados apícolas del anacardo en apiterapia, y menciona que luce prometedor su estudio ya que estos derivados tienen numerosas propiedades terapéuticas por la riqueza en compuestos fenólicos; sin embargo podría ser controversial por las evidencias de los alergenicos que presenta.

3.2.2.4 USOS MEDICINALES DEL *Anacardium occidentale*

El empleo de ésta especie está orientado a las hojas, corteza, resina, pedúnculo, fruto, epicarpio del fruto, raíz y flores.

Pardo (2003)²⁹ hace referencia que en Mozambique practican la inhalación de sus hojas frescas, o de su corteza en decocción, para tratar casos de tos. Refiere que la corteza en decocción es usada también, en la Amazonía peruana, en casos de úlceras dérmicas,

hemorragias dentales, como contraceptivo y antiséptico vaginal (en duchas), útil en el tratamiento de Diabetes (tal como sucede en Brasil y Colombia) como antidiarreica (así como en Brasil, Colombia, Cuba y Honduras) y también contra inflamaciones e irritaciones de la garganta (al igual que en Brasil y Honduras) Así mismo, en Honduras se emplea en gargarismos, y en Colombia como tópico en inflamaciones, aftas bucales y placas en la garganta.

Menciona que la corteza en infusión es considerada, en Argentina, como un buen remedio contra las enfermedades nerviosas.

Ogulana y Ramstad (citados por House y col. 1995)⁵⁴ mencionan que las hojas del *Anacardium occidentale* poseen actividad antibacteriana significativa sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Jansen y Méndez (1990)⁵⁵ mencionan que las hojas frescas aplicadas externamente son útiles en casos de erupciones cutáneas.

Pardo (2003)²⁹ refiere que las hojas frescas en decocción se emplean, en Mozambique, en casos de diarrea y disentería, y a su vez mezcladas con hojas de kakana (*Monordia balsamina*) se emplean en casos de Varicela y fiebres en general; afirma además que en Honduras y Perú se utilizan como anti-febrífugas, en Ecuador se indican en casos de reumatismo, y en Brasil son útiles para tratar casos de resfrío. Hace referencia también que las hojas en infusión son empleadas en Brasil, Colombia, Guatemala, Honduras, Perú y Panamá como anti diarreicas, en este último país también es utilizada para combatir la hipertensión, en Perú y Brasil son indicadas para tratar la Diabetes, en Colombia ante aftas y ulceraciones en la cavidad bucal, y en Cuba son empleadas contra el resfrío y el dolor de garganta (como gargarismos).

Kadiri y col. (1999)⁵⁶ mencionan que los retoños de las hojas son útiles en el tratamiento de enfermedades renales.

Pardo (2003)²⁹ plantea que la resina extraída del tronco del árbol disuelta en agua es eficiente en el tratamiento contra la tos.

En Colombia el pedúnculo en forma de jarabe alivia las enfermedades del pecho al ser un buen expectorante y eficaz contra la tos. La decocción de este pedúnculo sirve para tratar casos de Diabetes y para purificar la sangre, ya que las globulinas del merey disminuyen el colesterol⁵⁷, también se hace mención sobre la presencia de aflatoxinas⁵⁸ y de alérgenos proteicos.⁵⁹

Con la decocción del pedúnculo, seco y en polvo, también se combaten parasitosis intestinales. En Bolivia, Colombia y Cuba se prepara un vino que se dicen sería un excelente antidisentérico. En Bolivia el pseudofruto fresco, cortado y macerado en agua se emplea contra los dolores estomacales; también es considerado un buen tónico para el corazón.²⁹

Hoyos (1985)⁶⁰ destaca el uso del jugo del pedúnculo como un gran antidiarreico; y menciona además el uso de la corteza en decocción como antidiabético.

Pardo (2003)²⁹ refiere que la raíz en decocción es útil como purgante en Brasil; en Colombia la infusión de las flores sirve como astringente, tónico y afrodisíaco; y en la Amazonía peruana es beneficioso para tratar la diabetes.

Gonzáles (2007)¹² reconoce al *Anacardium occidentale* como antidiarreico y antibacteriano, y hace mención que estará incluida en la Farmacopea de Plantas Medicinales del Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba

3.2.2.5 TOXICIDAD

Los extractos del polen del *Anacardium occidentale* se han vinculado con alergias asmáticas durante la floración en Brasil⁶¹ y se conocen casos de dermatitis por contacto prolongado.⁶²

Waizel-Bucay y col. (2007)²⁴ refieren que el aceite del pericarpio al ser un peligroso cáustico enérgico puede ocasionar dermatitis, debido a presentar alquenilfenoles en su composición.

Pardo (2003)²⁹ menciona que dentro de las diferentes aplicaciones del aceite de la cáscara del *Anacardium occidentale*, muchas veces se advierte la causticidad del mismo.

Melo y col. (1999)¹⁶ evaluaron la toxicidad pre clínica aguda del extracto de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* en animales de laboratorio, los cuales no mostraron alteración alguna a nivel hematológico, sin embargo evidenciaron un aumento significativo en los niveles séricos de las transaminasas AST y ALT debido a que la dosis administrada fue cerca de 350 veces la usualmente empleada. Concluyeron que el aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* es prácticamente atóxico.

3.2.2.6 CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale*

El fruto seco del *Anacardium occidentale* constituye la décima parte del peso total del fruto, y está compuesta de tres partes: la cáscara, el aceite y la nuez. La cáscara de esta nuez es rica en compuestos caracterizados químicamente por presentar una cadena lineal de 15 carbonos con varios grados de instauración; donde resaltan los fenólicos derivados del ácido salicílico y el resorcinol (denominados ácidos anacárdicos, cardoles y 2-metilcardoles¹) que poseen

actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*.⁶³ Contiene casi el 50 % de aceite, a temperatura ambiente tiene comportamiento líquido, de color amarillo claro y un ligero olor característico.

3.2.2.7 ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ

Es un líquido cáustico que se extrae de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale*, es de color oscuro, y en su composición predomina el ácido oléico (conforma cerca del 75 % de los ácidos grasos presentes).

Estudios realizados indican que este aceite posee propiedades antibacterianas y antifúngicas.¹² Al ser rico en fenoles como el cardol, el cardanol y los ácidos anacárdicos han sido estudiados también como derivado fenólico, para su aplicación en la síntesis de polímeros al producir adhesivos, laminados, pinturas y plásticos.⁶⁴

3.2.2.8 USOS MEDICINALES DEL ACEITE

Pardo (2003)²⁹ hace referencia que en Argentina, Bolivia, Colombia y Cuba este aceite es empleado para eliminar verrugas y callos, ya que contiene un aceite de cardol, que es un agente vesicante. Indica también que en otros países es indicado en el tratamiento de úlceras y enfermedades persistentes de la piel, y contra la lepra.

Jansen y Méndez (1990)⁵⁵ refieren que en Mozambique el aceite es aplicado externamente para tratar verrugas y callos, pero añade que administrado oralmente tiene acción hipoglicémica.

Hoyos (1985)⁶⁰ menciona que en Venezuela el aceite de la cáscara de la nuez extraída es utilizada, también, para la eliminación de verrugas.

Kubo (1999)⁶⁵ mencionó que el ácido anacárdico presenta actividad antibacteriana sobre *Helicobacter pylori*, principal microorganismo etiológico de algunas úlceras gástricas.

Ferreira y col. (2005)¹⁴ evaluaron la actividad antifúngica “*in vitro*” del aceite sobre microorganismos del género *Candida*, y compararon su actividad con la del gluconato de Clorhexidina (0,12 %). Concluyeron que el aceite presentó una potente actividad antifúngica sobre cada uno de los microorganismos ensayados, y que se obtuvieron mejores resultados respecto al control positivo.

3.2.2.9 USOS ODONTOLÓGICOS

Este aceite tiene múltiples aplicaciones industriales; una de estas tantas aplicaciones es su comprobada acción antimicrobiana, entre ellos contra el principal agente etiológico de la caries dental, *Streptococcus mutans*; esta propiedad bactericida se debe a los compuestos con núcleos de ácido anacárdico y al grado de insaturaciones de la cadena alifática sustituyente a dichos núcleos, siendo mayor cuanto más insaturada sea.⁶⁶

Waizel–Bucay y col. (2007)²⁴ mencionaron que el aceite de la nuez del *Anacardium occidentale* L. (*Anacardiaceae*) es útil al momento de tratar una odontalgia, ya que elabora ácidos anacárdicos y totarol. Indicaron que la aplicación de la esencia debe de ser directa a la lesión, con la ayuda de una torunda de algodón, y de únicamente una gota del aceite.

El Gabinete de Estudios de Medicina Tradicional (1981)⁶⁷ en su *Cuaderno de Saúde* señala como odontálgico al *Anacardium occidentale*; pero no especifica que procedimiento seguir ni la parte del fruto empleada, tampoco mencionan si dicha actividad fue o no constatada por el Gabinete.

Lima y col. (2000)¹⁷ realizaron un estudio de la actividad antibacteriana sobre diversos microorganismos que prevalecen en la cavidad oral, demostrando que el mayor efecto bactericida es sobre *Streptococcus mutans*.

Pereira y col. (2006)¹³ también comprobaron la actividad antimicrobiana del extracto del *Anacardium occidentale* sobre los *Streptococcus mutans*.

Guatibonza (1999)⁶ demostró el efecto bactericida del *Anacardium occidentale* sobre *Streptococcus mutans*; diluyendo el extracto y obteniendo varias fracciones comparó el efecto bactericida de cada una de estas.

Pinto y col. (1999)⁶⁸ estudiaron cinco fracciones del aceite sobre *Streptococcus mutans* determinando que la mayor acción antimicrobiana se logró con 0,312 ug/mL en comparación con las fracciones restantes y con el extracto crudo, y que dicha fracción presentó una acción antimicrobiana superior a la de la Clorhexidina 0,12 % (CMI 4,000 ug/mL).

3.2.2.10 INDUSTRIALIZACIÓN

Garzón y col. (2002)³ estudiaron el efecto de las formación de sales de los componentes activos del líquido de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre *Streptococcus mutans*, para ello emplearon como diluyente al Hidróxido de Sodio (NaOH) al 0.1 N, demostrando ser una buena opción para solubilizarlo y así permitir su utilización en un medio acuoso sin afectar su actividad bactericida. Se obtuvo una acción a las 144 horas superior a la reportada con la Clorhexidina al 0,12 %.

Medina (2003)⁶⁶ determinó que la exposición del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* a temperaturas superiores a 96°C afectan sus propiedades físico-químicas y con ello su actividad

antibacteriana. Simuló los tratamientos más comunes en la industrialización de la almendra, evaluó la actividad antimicrobiana de las muestras (del extracto crudo y de cinco fracciones estudiadas) y precisó cuáles son los componentes con mayor actividad. Tras el estudio concluyó que el tratamiento a 92° C no afecta la actividad antibacteriana, a 150° C no afectan la actividad bacteriostática pero disminuye la bactericida y a 200° C disminuye ambas.

3.2.3 MICROBIOLOGÍA ORAL

La cavidad bucal está colonizada por más de 400 especies de bacterias, entre aerobias y anaerobias, la mayoría transitorias; los residentes propios se calculan en aproximadamente 20 especies. Estos son importantes porque impiden la fácil instalación de gérmenes patógenos y estimulan la inmunidad.⁷

Las bacterias anaerobias superan en número a las aerobias, la proporción oscila entre 10:1 y 100:1. Estas bacterias habitan en toda la cavidad y pueden actuar como patógenos involucrados en las principales infecciones de la cavidad bucal.⁸

La cavidad oral es considerada un ecosistema con complejas interrelaciones ya que comprende una serie de nichos ecológicos - con diversas características físicas, químicas y nutricionales- y una flora determinada; por ejemplo, para el establecimiento del *Streptococcus mutans* es necesaria la presencia de la superficie dental.⁷

3.2.3.1 CARIES DENTAL

La caries dental es la infección más frecuente en la cavidad oral, y es el resultado del aumento de la placa dental favorecida por la formación de productos ácidos,⁷ la cual al no ser tratada puede propagarse y desarrollar infecciones polimicrobianas en distintas zonas, como en los senos paranasales, el espacio sublingual, el paladar, el sistema nervioso central, el endocardio, o en los pulmones.⁸

Considerada una enfermedad multifactorial está determinada por modificaciones en el equilibrio de los diferentes ecosistemas de la cavidad oral, para que esta patología se produzca es necesaria la unión de varios factores como las características propias del huésped, la dieta, el tiempo y las bacterias que se encuentran como habitantes normales en la boca.⁹

3.2.3.1.1 MICROBIOLOGÍA DE CARIES DENTAL

La caries dental constituye una de las enfermedades crónicas que afectan a una gran cantidad de personas en el mundo. Se puede definir como una “enfermedad infecciosa crónica transmisible, causantes de la destrucción localizada de las estructuras dentales por los ácidos microbianos adheridos a ellas”.⁷

Esta enfermedad se caracteriza por la destrucción de las estructuras dentarias debido a la descalcificación de las mismas.

Estudios realizados plantean que los *Streptococcus mutans* son los microorganismos más relacionados al inicio de la actividad cariosa, encontrándose también durante esta patogénesis a los *Lactobacillus sp.* y a los *Actinomyces sp.*¹⁰

La evolución de la patología se lleva a cabo cuando los *Streptococcus mutans* se asocian con microorganismos proteolíticos y degradan las proteínas del diente.¹¹

Para el desarrollo de la caries dental como una enfermedad multifactorial, es necesaria la interacción de los siguientes factores: El hospedero, la microbiota oral, la dieta, y el tiempo.⁷

3.2.3.1.1.1 STREPTOCOCCUS MUTANS

Son microorganismos, cocos Gram (+) agrupados en pares o cadenas, no esporulados, inmóviles, presentan un metabolismo fermentativo y son anaerobios facultativos con requerimientos nutricionales complejos. Constituyen el grupo más predominante de la cavidad bucal, acercándose casi al 30 % del total de la flora cultivable.⁶⁹

Se sabe que además de ser los microorganismo más aislados en lesiones cariosas humanas, son los primeros en colonizar la superficie dentaria una vez erupcionado el diente.⁷⁰⁻⁷¹ Sobre la base del desarrollo en *Agar Sangre* se dividen el alfa, beta y gama hemolíticos; de estos los denominados *viridans* (alfa) son los que están relacionados con la mayoría de los procesos bucales.⁷

La clasificación de los *Streptococcus* orales, se basan en las reacciones bioquímicas, análisis de pared celular, clasificación serológica y el contenido de ADN.

Una clasificación basada en características morfológicas en *Agar Mitis Salivarius* y bioquímicas fue propuesta por Carlsson: Grupo I

(*sanguis*), Grupo II (*mutans*), Grupo III (*salivarius*), Grupo IV (no determinado), y Grupo V (*mitis*). En la actualidad existe la clasificación de los *Streptococcus* orales en los siguientes grupos: *sanguis*, *mutans*, *salivarius*, *mitis* y *milleri*.⁷

Los *Streptococcus mutans*, descritos por Clarke (1924), son genéticamente heterogéneos, de acuerdo a su estructura antigénica. Se ha determinado por métodos serológicos ocho tipos (a-h): serotipo a (*S. cricetus*), serotipo b (*S. ratus*), serotipo c, e, f (*S. mutans*), serotipo d, g (*S. sobrinus*), y serotipo h (*S. downei*),⁷ de ellos los del serotipo c son señalados como los más importantes en el inicio de la caries dental, al ser los primeros colonizadores.¹⁰

Otra característica es su corto efecto post - pH, que puede definirse como el tiempo necesario para recuperar su actividad de crecimiento habitual cuando, tras estar sometidos a un pH bajo, éste vuelve a la normalidad.

Por todo lo expuesto se estima que estas especies son las que consiguen alcanzar más rápidamente el pH crítico de 4,5 necesario para iniciar la desmineralización.⁷²

3.2.3.1.1.2 STREPTOCOCCUS MUTANS MUTANS

Considerado cariogénico, constituye cerca del 90 % del total de microorganismos de aquellos quienes son portadores de los *Streptococcus*; se localizan en lengua y saliva, y se clasifican en dos tipos (tipo I, similar al grupo K de Lancefield, y tipo II).⁷

Pueden sintetizar polisacáridos extracelulares solubles (dextranos, fructanos) e insolubles (mutanos) y además producir polisacáridos intracelulares. En *Agar mitis salivarius*, en anaerobiosis inicial, se observan colonias altas, convexas, azules, zoogléicas, de aspecto

vidriado, opacas, de 0,5 y 1 mm de diámetro, aspecto liso o rugoso. Fermentan manitol, sorbitol, rafinosa. No producen H₂O₂. Produce enzimas como glucosil transferasa, fructosil transferasa, dextranasa, invertasa.⁷

En *Agar Mitis Salivarius*, añadiéndole 0,2 U/ml. de Bacitracina y aumentando la concentración de sacarosa en un 20 % a estas concentraciones los agentes selectivos permiten el crecimiento de *Streptococcus mutans* con una máxima inhibición de la restante flora *Streptococcica*; se presentan de forma circular o irregular, de un tamaño entre 0.5 y 1 mm de diámetro, elevadas, y algunas veces presentan una gota de polisacáridos extracelulares brillante en la parte superior o a un lado.

3.2.3.1.2 FACTORES DE VIRULENCIA

Los factores de virulencia son aquellas condiciones o características específicas de cada microorganismo que lo hacen patógeno. El *Streptococcus mutans* es considerado un patógeno de poca virulencia, sin embargo es el agente causal de la caries dental, que sin ser mortal es una de las patologías más frecuentes a escala mundial.

La acidogenicidad, acidofilicidad, aciduricidad, la síntesis de polisacáridos intracelulares (como el glucógeno), la síntesis de glucanos y fructanos, además de la producción de dextranasa, son los principales factores de virulencia del *Streptococcus mutans* en la caries dental.⁹⁻¹⁰

Los *Streptococcus mutans* son acidógenos, ya que producen ácidos a partir del metabolismo de la sacarosa, principalmente ácido láctico, fundamental en la virulencia al ser aparentemente el más potente en la desmineralización del tejido dental; son acidófilos, o tolerantes al ácido, lo que les permite sobrevivir y desarrollarse en un pH bajo; y

son definidos también como acidúricos al poseer la capacidad de seguir produciendo ácidos bajo condiciones ácidas.

Los *Streptococcus mutans* sintetizan polisacáridos intracelulares, y su capacidad de metabolizarlos proporcionan a la célula un sustrato de donde pueden obtener la energía necesaria para seguir produciendo ácido durante un largo periodo.

La síntesis de glucanos y fructanos es también un factor de virulencia; estos polímeros son producidos por enzimas como la glucosil y la fructosiltransferasas (GTF y FTF) a partir de la sacarosa; los glucanos insolubles pueden ayudar a la célula a adherirse al diente y ser usados como reserva de nutrientes.

La producción de dextranasa, enzima capaz de metabolizar los polisacáridos extracelulares -sobre todo los glucanos solubles- es también un factor de virulencia, esta enzima es capaz de movilizar reservas energéticas, y regular la actividad de las glucosiltransferasas, removiendo los productos finales de glucano.

3.2.3.1.3 FUENTES DE INFECCIÓN

La caries dental ocurre cuando los metabolitos ácidos de los *Streptococcus mutans* disuelven la dentina, esta disolución progresa a cavitación, si no es tratada invade la pulpa dental y de allí las bacterias pueden acceder a la circulación sanguínea.⁷³

Varios medios de cultivo y técnicas se han empleado en la determinación del grado de infección por *Streptococcus mutans*.⁷⁴⁻⁷⁵ Actualmente el recuento de *S. mutans* se usa como ayuda diagnóstica para seleccionar grupos de pacientes con riesgo de caries. Recuentos superiores a 100 000 UFC/mL de *Streptococcus*

en saliva se consideran indicadores de riesgo de caries, y recuentos salivales más bajos concuerdan con una tendencia mínima a contraer esta enfermedad.⁷⁶⁻⁷⁷

Los altos grados de infección por *Streptococcus mutans* ($>10^6$ UFC, $>10^5$ mL/saliva) significan presentar elevado riesgo a contraer caries dental además de ser fáciles transmisores del microorganismo.

3.2.3.1.4 FACTORES DE RIESGO EN LA APARICIÓN DE CARIES DENTAL⁷³⁻⁷⁷

Los factores que influyen en la producción de caries son:

- Existencia de susceptibilidad congénita a la caries.
- Solubilidad de los tejidos del diente a los ácidos orgánicos débiles.
- Presencia de bacterias acidogénicas y acidúricas, y de enzimas proteolíticas.
- Dieta rica en hidratos de carbono, especialmente azúcares, ya que estas proliferan el desarrollo de las bacterias cariogénicas.
- Neutralización de la saliva por parte de los ácidos orgánicos ya producidos, principalmente del ácido láctico, de manera que puedan efectuar sus reacciones descalcificadoras en la sustancia mineral del diente.
- Presencia de la placa dentobacteriana de León Williams. Esta es una película adherente esencial en todo proceso carioso.

3.3 HIPÓTESIS

3.3.1 HIPÓTESIS GENERAL

El Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* presenta actividad antibacteriana *in vitro* sobre ambos tipos de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC y procedente de pacientes.

3.3.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

El Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* presenta actividad antibacteriana *in vitro* sobre una cepa de *Streptococcus mutans* obtenida a partir de una muestra de paciente.

El Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* presenta actividad antibacteriana *in vitro* sobre una cepa de *Streptococcus mutans* de la colección ATCC.

El Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* presenta mejor actividad antibacteriana *in vitro* sobre *Streptococcus mutans* en comparación con la actividad que presenta la Clorhexidina al 0,12 %.

Las diferentes concentraciones del Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* presentan el mismo efecto antibacteriano *in vitro* sobre cada tipo de cepas de *Streptococcus mutans*.

3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.4.1 CONCEPTUALIZACIÓN DE VARIABLES

3.4.1.1 VARIABLE INDEPENDIENTE

Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale*

El Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* es un líquido cáustico, de color oscuro, compuesto principalmente por ácido oleico, que posee propiedades antibacteriana y antifúngica,¹² fue diluido con Hidróxido de Sodio 0.1 N, obteniéndose de ese modo diferentes concentraciones.

3.4.1.2 VARIABLE DEPENDIENTE

Efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans*

Acción de determinadas sustancias químicas capaces de inhibir en pequeñas cantidades los procesos vitales de ciertos microorganismos, destruyendo e impidiendo su desarrollo y reproducción.

3.4.1.3 COVARIABLE

Tipo de cepa de *Streptococcus mutans*

Los *Streptococcus mutans* son microorganismos cocos Gram (+) agrupados en pares o cadenas, no esporulados, inmóviles, que presentan un metabolismo fermentativo y son anaerobios facultativos con requerimientos nutricionales complejos. Constituyen el grupo más predominante de la cavidad bucal, entre el 20 y 30 % de la flora cultivable.⁶⁹ Se sabe que además de ser los microorganismos más aislados en lesiones cariosas humanas, son los primeros en colonizar la superficie dentaria una vez erupcionado el diente.⁷⁰⁻⁷¹ Pueden ser aislados a partir de muestras de pacientes u obtenerse de la colección ATCC 25175.

3.4.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE		DIMENSIÓN	DEFINICIÓN OPERATIVA	INDICADOR	ESCALA	CATEGORIA
INDEPENDIENTE	Tipo de Aceite de la cáscara de la nuez del <i>Anacardium occidentale</i> .	Grado de concentración del aceite de la cáscara de la nuez del <i>Anacardium occidentale</i> .	El Aceite de la cáscara de la nuez del <i>Anacardium occidentale</i> fue diluido con Hidróxido de Sodio 0.1 N, obteniéndose de ese modo diferentes concentraciones.	Cantidad de Aceite diluido en Hidróxido de Calcio 0.1 N	Nominal	Aceite 30 % Aceite 40 % Aceite 50 % Aceite 60 % Aceite 100 % Control Positivo (Clorhexidina al 0.12 %). Control Negativo (Hidróxido de Sodio 0.1N).
DEPENDIENTE	Efecto antibacteriano sobre <i>Streptococcus mutans</i> .	Grado de susceptibilidad antibacteriana.	Acción de determinadas sustancias químicas capaces de inhibir en pequeñas cantidades los procesos vitales de ciertos microorganismos.	Halos de inhibición, medidos en milímetros.	Cuantitativa	---
COVARIABLE	Tipo de cepa de <i>Streptococcus mutans</i> , según el origen o procedencia.	---	Los <i>Streptococcus mutans</i> pueden ser aislados a partir de muestras de pacientes u obtenerse de la colección	Cepa según su procedencia	Nominal	Cepa patrón ATCC. Cepa obtenida de pacientes.

IV. METODOLOGIA

4.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio microbiológico fue de tipo *in vitro*, ya que se aislaron y trabajaron con cepas de *Streptococcus mutans* que luego fueron sometidas a condiciones de laboratorio para su desarrollo.

De tipo cuasi experimental, caracterizado por la manipulación artificial del factor de estudio pero sin aleatorización; transversal, por desarrollarse en un solo periodo temporal, y prospectivo porque los datos se analizaron transcurrido un determinado tiempo en el futuro.

4.2 MUESTRA

Cepa de *Streptococcus mutans* obtenida y aislada a partir de muestras obtenidas de lesiones cariosas incipientes de pacientes.

Cepa patrón de *Streptococcus mutans*, procedente de colección ATCC 25175.

4.2.1 TIPO DE MUESTRA

No probabilístico, intencional.

4.2.2 UNIDAD DE ANÁLISIS

Cepa de *Streptococcus mutans* ATCC y aislada de muestras de pacientes.

4.3 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICA

4.3.1 RECOLECCIÓN DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale*

La siembra, cultivo y recolección de las nueces de *Anacardium occidentale* fueron realizadas a temperatura entre los 18 °C y 26 °C, en zonas sin heladas, y bajo precipitaciones entre 800 y 1500 mm., características del suelo donde mejor desarrollo tiene, coincidentes con las del suelo de la ciudad de Iquitos, departamento de Loreto.

El fruto seco del *Anacardium occidentale*, aún fresco, fue inmediatamente limpiado y secado con una franela, y trasladada en recipientes limpios, secos y ventilados (evitando así que se deteriore); se desechó las partes manchadas y enfermas; se procedió a secar a temperatura ambiente durante una semana; posteriormente se empaquetó cerca de cinco kilogramos de lo recolectado en un recipiente limpio, hermético y seco y finalmente se transportó por vía terrestre hasta la ciudad de Lima - Perú.

4.3.2 EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale*

Los equipos y materiales utilizados fueron los correspondientes al Laboratorio de Química Orgánica y a la Sala de Secado y Molienda de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ubicada dentro de la Facultad de Medicina de la UNMSM, Lima – Perú.

4.3.2.1 Lavado de la Nuez del *Anacardium occidentale*

Se seleccionaron las nueces que se encontraban en mejor estado de conservación, secas, y libres de partes manchadas y/o enfermas; con lo cual la muestra pesó 4, 100 kilogramos aproximadamente.

Se realizó el lavado de cada nuez con detergente disuelto en agua corriente, y a medida que las nueces iban siendo lavadas fueron depositadas en un recipiente limpio y seco, el cual posteriormente fue llenado con casi dos litros de agua corriente y le fue agregado casi 20 ml. de Hipoclorito de Sodio al 5 %. Durante quince minutos se estuvo moviendo con una paleta plástica estéril la muestra sumergida con el fin de eliminar aquellos microorganismos retenidos en la capa superficial de las nueces.

Posteriormente la muestra fue enjuagada tres veces con agua destilada, y luego secada una a una con una gasa estéril grande. Finalmente las nueces fueron depositadas en un recipiente limpio y seco que previamente fue forrado con papel kraft.

4.3.2.2 Secado y Molinado de la Nuez del *Anacardium occidentale*

Se dejó la muestra en la Sala de Secado y Molienda durante 48 horas, evitando la incidencia de sol directo y el polvo atmosférico, en un ambiente libre de humedad excesiva, ya que estas condiciones deterioran el material destruyendo sus propiedades medicinales, con la consecuente disminución de la calidad de la materia prima. Lo recomendable es secar aproximadamente a 10 % de humedad.⁷⁸

Las nueces fueron dejadas sobre papel kraft, separadas aproximadamente tres centímetros una de otra, y pasadas las

primeras 24 horas se dio vuelta a cada una de las nueces con el objetivo de lograr un mejor secado y evitar así el riesgo de contaminación por hongos.

Posterior al secado a temperatura ambiente, se llevó el total de la muestra a una estufa donde permaneció durante 48 horas a una temperatura de 37 °C.

4.3.2.3 Separación de la Cáscara de la Nuez

Una vez que se tuvo las nueces completamente limpias y secas, se procedió a triturar con un “rompenuez”, luego de ello se retiró el fruto seco que se hallaba en el interior, y tras limpiar la parte interna de cada uno de los trozos obtenidos de la cáscara y con la ayuda de un mortero se pulverizó los pequeños trozos de la muestra, para poder depositarla en un cartucho de material poroso que se sitúa en la cámara del extractor Soxhlet.

La muestra que no sería utilizada en el proceso fue guardada en el refrigerador a una temperatura de 10° C.

4.3.2.4 Proceso de extracción del Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale*

El procedimiento para llevar a cabo su extracción se basa en la extracción sólido-líquido, en continuo, empleando un disolvente, con posterior evaporación de éste y pesada final del residuo.

La extracción sólido-líquido, o Soxhlet, es la técnica de separación sólido-líquido comúnmente usada para la determinación del contenido graso en muestras de diferente naturaleza. Aunque su

campo de aplicación es fundamentalmente el agroalimentario es también de utilidad en aceites vegetales, grasas animales, ceras, jabones y compuestos relacionados.

En primer lugar, se colocaron trescientos gramos de muestra homogeneizada, distribuidos en dos cartuchos de extracción, los cuales fueron ubicados en las piezas medias de los dispositivos de extracción Soxhlet o compartimento de muestra. Se montó la parte inferior de cada dispositivo (con el pie de bureta, la manta calefactora, el matraz y el Soxhlet, pero sin el reflujo). Se vertió por la parte superior del Soxhlet aproximadamente 500 ml de Eter de petróleo 35-60 °C en cada dispositivo. El éter al ser un disolvente muy volátil y muy inflamable, además de tener efectos narcóticos, se manejó en todo momento debajo de una campana con el motor del extractor en marcha.

Se procedió entonces a taponar la parte superior del reflujo con desecante (sulfato sódico anhídrido) envuelto en algodón para evitar la entrada y condensación de vapor de agua. Tras el montaje de cada uno de los dispositivos se encendieron las estufas y se reguló el caudal de agua del reflujo. El éter, una vez que alcanza su temperatura de ebullición, se evapora y llega al refrigerante condensándose y cayendo en el compartimento del cartucho de muestra.

Durante el proceso de extracción se supervisó que el compartimento de la muestra se vacíe regularmente a través del conducto ascendente (asa), de modo que el disolvente fue recirculando completándose lo que se denominan ciclos de extracción. Se dió por finalizada la extracción una vez completados diez ciclos, luego de aproximadamente cinco horas. El procedimiento se repitió al día siguiente, en idénticas condiciones.

Los extractos obtenidos fueron depositados en envases de vidrio resistentes al paso de la luz solar, cerrados herméticamente, y colocados en un lugar fresco a temperatura ambiente y libre de humedad; y rotulados debidamente.

4.3.3 DILUCIÓN DEL EXTRACTO

Posteriormente, el aceite extraído fue diluido con Hidróxido de Sodio al 0.1 N obteniéndose así cuatro concentraciones distintas: 30, 40, 50, 60 y 100 %. Se consideró la misma cantidad para cada una de las diluciones, e inmediatamente después de llevar a cabo las diluciones se embebieron los discos de papel filtro que serían colocados en las placas petri.

4.3.4 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

4.3.4.1 PACIENTES

Se seleccionó al azar a ocho pacientes, de todas aquellas que eran atendidas en la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la UNMSM durante el mes de Abril del 2010, que presentaran lesiones de caries incipiente en al menos una de las primeras molares superiores o inferiores; cuatro correspondieron al sexo femenino y cuatro al sexo masculino, y sus edades fluctuaban entre los 20 y 30 años de edad, Todos accedieron mediante consentimiento informado para participar en el estudio.

4.3.4.2 CULTIVO BACTERIANO

Cultivo de referencia cepa patrón de *Streptococcus mutans*, procedente de colección ATCC 25175.

4.3.5 PROCEDIMIENTO

Los equipos y materiales utilizados fueron los correspondientes al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ubicada dentro de la Ciudad Universitaria.

4.3.5.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE PLACA DENTAL

Para el estudio se obtuvo muestras de placa dental provenientes de las fosas y fisuras de las primeras molares de cada uno de los pacientes elegidos, las cuales fueron tomadas dos horas después de haber ingerido el primer alimento del día, minutos después de haberse enjuagado con agua potable. Previamente se advirtió a cada paciente que el día anterior no se debería de realizar algún tipo de limpieza bucal.

Para la obtención de la muestra de placa bacteriana se realizó el aislamiento relativo con torundas de algodón estériles, se secó la pieza elegida con aire proveniente de la jeringa triple, y se procedió a la toma de muestra con una cureta para dentina estéril. La muestra fue transportada en un tubo de prueba conteniendo Caldo Trypticase Soya y el procesamiento se efectuó hasta una hora después de obtenida la muestra.

Las seis muestras fueron tomada el mismo día, y siguieron el mismo procedimiento de toma, de transporte y procesamiento.

4.4 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

4.4.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

Las siembras se realizaron en dos placas de Agar Mitis Salivarius Bacitracina por muestra, las que fueron incubadas a 37 °C, una de ellas en aerobiosis y la otra en presencia de CO₂. El tiempo de incubación para la placa de aerobiosis fue de 24 horas a 37 °C y para la placa en presencia de CO₂ 48 horas a 37° C, la lectura para ambas placas fue de 24 horas después de conservarse a temperatura ambiente.

El repique de las colonias fue hecho atendiendo a las características dadas por Carlsson⁸⁰ como son forma, tamaño, consistencia, color; las que fueron trasladadas a tubos conteniendo Caldo Trypticase Soya, y luego incubadas a 37° C durante 24 horas.

Para la identificación bioquímica de las colonias se siguió el procedimiento descrito según Carlsson⁸⁰ (ver Cuadro 1) se resembró para la observación de la Catalasa, en tubos con Agar Trypticase Soya a 37 °C por 72 horas. Para observar la precipitación en caldo Sacarosa al 5 %, se incubó a 37 °C durante 7 días, al término de los cuales se agregó Etanol en la relación de 1 y 3 volúmenes para conseguir la precipitación de los polisacáridos extracelulares .La hemólisis fue apreciada en placas con Agar Trypticase Soya con sangre de carnero al 5 % incubado a 37° C por 48 horas en ambiente de CO₂. Para diferenciar los *Streptococcus mutans* de las otras especies de *Streptococcus* se realizó la prueba de fermentación del Manitol, sembrando en tubos con caldo base Rojo de Fenol con Manitol al 1 % e incubados a 37 % por 7 días. La producción de ácido se determinó tras observar la variación del color rojo del indicador al amarillo.

Cuadro 1: Características del grupo de *Streptococcus mutans* según Carlsson.⁸⁰

PRUEBA	MEDIO DE CULTIVO	INCUBACIÓN	RESULTADOS
Aislamiento	Agar Mitis salivarius Bacitracina	37 °C / 48 h. / 10 % CO ₂	Colonias lisas rugosas, mucoides zoogléicas.
Catalasa	Agar Trypticase Soya.	37 °C / 72 h.	Negativo.
Precipitación de Sacarosa.	Caldo sacarosa: Tryptosa, levadura K ₂ PO ₄ , H, Acetato de Sodio, Sacarosa 5 %	37 °C / 7 días	Positivo con 1 – 3 partes de alcohol.
Hemólisis	Agar Trypticase Soya	37 °C / 48 h. / 10 % CO ₂	Gamma.
Fermentación de Manitol.	Caldo Rojo de Fenol	37 °C / 7 días	Positivo.

La reactivación de la cepa patrón se realizó en placas con AgarTrypticase soya, incubados en CO₂ por 48 horas.

4.4.2 PRUEBA DE SENSIBILIDAD BACTERIANA

Para la realización de las pruebas se obtuvieron ocho cepas a partir de los pacientes muestreados, los que cumplían con las características de *S. mutans* según el cuadro 1, así también se procedió al estudio de la cepa patrón ATCC.

En cada una de las placas Petri se depositaron siete discos de papeles filtro de ¼ de pulgada, ubicados homogéneamente. Cada disco conteniendo a cada una de las sustancias que fueron

estudiadas. Los discos fueron rotulados externamente de la siguiente manera: 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 100 % (correspondientes a cada una de las diluciones del aceite extraído), Control positivo (Clorhexidina 0,12 %) y Control negativo (Hidróxido de Sodio 0.1 N).

Una vez realizada la siembra y colocados los discos, las placas Petri sembradas por duplicado se incubaron en condiciones anaeróbicas parcial (CO₂) en jarras para anaerobiosis a 37 °C durante 48 horas, y luego 24 horas a temperatura ambiente.

4.4.3 LECTURA DE RESULTADOS

Pasado el tiempo mencionado se realizó la medición de los halos de inhibición, lo cual indicó la mayor o menor sensibilidad de la bacteria a las diferentes sustancias.

4.5 ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis de resultados se realizó mediante cálculos estadísticos básicos para datos cuantitativos como promedios, desviaciones estándar y error de muestreo. Para los resultados de la actividad antibacteriana, y la comparación de la actividad de los diferentes grados de concentración del aceite, así como del control positivo, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de un factor, prueba de normalidad, test de homogeneidad; además se realizaron la prueba de T de Student, la prueba F, equivalente al T de Student y las pruebas post hoc para verificar la diferencia existente entre los resultados de dos o más sustancias.

El análisis estadístico fue desarrollado en el programa estadístico SPSS versión 19.

V. RESULTADOS

5.1 Análisis de la actividad antibacteriana de las diferentes concentraciones del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre *Streptococcus mutans*.

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos del análisis del conteo bacteriano (a las 72 horas) de la acción del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre las cepas de *Streptococcus mutans* aisladas de muestras de pacientes. Hubo acción antibacteriana sobre todas las cepas ensayadas por parte de todos los grados de concentración del aceite. Resultados similares se obtuvieron sobre las cepas obtenidas de la colección ATCC (ver tabla 2) todas evidenciadas por la presencia de halos de inhibición del crecimiento antibacteriano.

TABLA 1: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* AISLADAS DE MUESTRAS DE PACIENTES.

Aceite	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
30 %	8	27,5000	5,31843	1,88035	23,0537	31,9463	18,00	32,00
40 %	8	26,8750	4,64258	1,64140	22,9937	30,7563	19,00	30,00
50 %	8	25,5000	5,63154	1,99105	20,7919	30,2081	16,00	30,00
60 %	8	25,8750	6,81254	2,40860	20,1796	31,5704	15,00	32,00
100 %	8	28,8750	4,96955	1,75700	24,7204	33,0296	19,00	34,00
Total	40	26,9250	5,37510	,84988	25,2060	28,6440	15,00	34,00

* La media muestra el promedio de la medición de los halos de inhibición expresado en milímetros.

TABLA 2: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ADQUIRIDAS DE LA COLECCIÓN ATCC 25175.

Aceite	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
30 %	4	21,0000	1,15470	,57735	19,1626	22,8374	20,00	22,00
40 %	4	22,0000	3,46410	1,73205	16,4878	27,5122	19,00	25,00
50 %	4	19,5000	4,04145	2,02073	13,0691	25,9309	16,00	23,00
60 %	4	21,0000	4,61880	2,30940	13,6505	28,3495	17,00	25,00
100 %	4	23,0000	2,30940	1,15470	19,3252	26,6748	21,00	25,00
Total	20	21,3000	3,21346	,71855	19,7961	22,8039	16,00	25,00

* La media muestra el promedio de la medición de los halos de inhibición expresado en milímetros.

5.2 Relación entre la actividad antibacteriana de los diferentes grados de concentración del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre *Streptococcus mutans*.

Los resultados del efecto de las diferentes concentraciones de aceite sobre cepas de *S. mutans* aisladas de muestras de pacientes fueron evaluados entre ellos (ver Tabla 3) para determinar si su actividad era homogénea o si por lo menos un par de concentraciones tenían diferente acción. Los resultados observados indican que en cada uno de los aceites tienen similar acción en comparación con los otros aceites de diferente grado de concentración.

Es decir, no hay diferencias significativas entre los aceites según su grado de concentración. Actividad similar se registró sobre cepas adquiridas de la colección ATCC (ver Tabla 4).

TABLA 3: RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS DIFERENTES GRADOS DE CONCENTRACIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* AISLADAS DE MUESTRAS DE PACIENTES.

Grado de concentración del aceite	30 %	40 %	50 %	60 %	100 %
30 %		1,000	,970	,986	,993
40 %	1,000		,993	,998	,970
50 %	,970	,993		1,000	,826
60 %	,986	,998	1,000		,879
100 %	,993	,970	,826	,879	

* Mediante Análisis de Scheffé: La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

TABLA 4: RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS DIFERENTES GRADOS DE CONCENTRACIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ADQUIRIDAS DE LA COLECCIÓN ATCC 25175.

Grado de concentración del aceite	30 %	40 %	50 %	60 %	100 %
30 %		,996	,981	1,000	,947
40 %	,996		,888	,996	,996
50 %	,981	,888		,981	,706
60 %	1,000	,996	,981		,947
100 %	,947	,996	,706	,947	

* Mediante Análisis de Scheffé: La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

5.3 Comparación entre la actividad antibacteriana del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* y la del control positivo, sobre dos tipos de cepas de *Streptococcus mutans*.

Luego de observar el crecimiento de los halos de inhibición en el aceite y en el control positivo se compararon dichos resultados, con el objetivo de determinar si existe diferencia significativa a favor de uno de ellos. Esta comparación se realizó utilizando la media de todos los resultados obtenidos por las diferentes concentraciones del aceite sobre cepas aisladas de muestras de pacientes (ver Tablas 5) y posteriormente separando a aquellas que presentaron diferencia significativa, tanto en cepas aisladas de pacientes (ver Tablas 6) como en las adquiridas de la colección ATCC (ver Tabla 7).

Se observó que el crecimiento de los halos de inhibición por parte del aceite, en ambos tipos de cepa de *Streptococcus mutans*, es mayor que el desarrollado por el control positivo (Ver Tablas 5.1, 6.1 y 7.1) Es decir, se observó que el aceite tiene mejor efecto antibacteriano que la Clorhexidina al 0,12 %, y esta diferencia es estadísticamente significativa.

TABLA 5: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* Y LA DEL CONTROL POSITIVO SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* AISLADAS DE MUESTRAS DE PACIENTES.

Aceite	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
30 %	8	27,5000	5,31843	1,88035	23,0537	31,9463	18,00	32,00
40 %	8	26,8750	4,64258	1,64140	22,9937	30,7563	19,00	30,00
50 %	8	25,5000	5,63154	1,99105	20,7919	30,2081	16,00	30,00
60 %	8	25,8750	6,81254	2,40860	20,1796	31,5704	15,00	32,00
100 %	8	28,8750	4,96955	1,75700	24,7204	33,0296	19,00	34,00
C +	8	19,0000	2,00000	,70711	17,3280	20,6720	16,00	21,00
Total	48	25,6042	5,78604	,83514	23,9241	27,2843	15,00	34,00

* La media muestra el promedio de la medición de los halos de inhibición expresado en milímetros.

TABLA 5.1: COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* Y LA DEL CONTROL POSITIVO SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* AISLADAS DE MUESTRAS DE PACIENTES.

Grado de concentración del aceite	30 %	40 %	50 %	60 %	100 %	C +
30 %		1,000	,987	,995	,998	,071
40 %	1,000		,998	,999	,987	,115
50 %	,987	,998		1,000	,880	,285
60 %	,995	,999	1,000		,924	,227
100 %	,998	,987	,880	,924		,021
C +	,071	,115	,285	,227	,021	

* Mediante Análisis de Scheffé: La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

TABLA 6: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MENOR Y MAYOR CONCENTRACIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* Y LA DEL CONTROL POSITIVO SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* AISLADAS DE MUESTRAS DE PACIENTES.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
30 %	8	27,5000	5,31843	1,88035	23,0537	31,9463	18,00	32,00
100 %	8	28,8750	4,96955	1,75700	24,7204	33,0296	19,00	34,00
C +	8	19,0000	2,00000	,70711	17,3280	20,6720	16,00	21,00
Total	24	25,1250	6,10283	1,24574	22,5480	27,7020	16,00	34,00

* La media muestra el promedio de la medición de los halos de inhibición expresado en milímetros.

TABLA 6.1: COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MENOR Y MAYOR CONCENTRACIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* Y LA DEL CONTROL POSITIVO SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* AISLADAS DE MUESTRAS DE PACIENTES.

Grado de concentración del aceite	30 %	100 %	C +
30 %		,821	,003
100 %	,821		,001
C +	,003	,001	

* Prueba post hoc: La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

TABLA 7: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MENOR Y MAYOR CONCENTRACIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* Y LA DEL CONTROL POSITIVO SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ADQUIRIDAS DE LA COLECCIÓN ATCC.

Aceite	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
30 %	4	21,0000	1,15470	,57735	19,1626	22,8374	20,00	22,00
100 %	4	23,0000	2,30940	1,15470	19,3252	26,6748	21,00	25,00
C +	4	21,0000	,00000	,00000	21,0000	21,0000	21,00	21,00
Total	12	21,6667	1,66969	,48200	20,6058	22,7275	20,00	25,00

* La media muestra el promedio de la medición de los halos de inhibición expresado en milímetros.

TABLA 7.1: COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MENOR Y MAYOR CONCENTRACIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* Y LA DEL CONTROL POSITIVO SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ADQUIRIDAS DE LA COLECCIÓN ATCC.

Grado de concentración del aceite	30 %	100 %	C +
30 %		,220	1,000
100 %	,220		, 220
C +	1,000	,220	

* Prueba post hoc: La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

5.4 Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre dos tipos de cepas de *Streptococcus mutans*.

En la tabla 8 se observa la comparación de la actividad antibacteriana del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre dos tipos de cepa de *Streptococcus mutans*: cepa aislada de muestras de pacientes, y cepa patrón ATCC. Se determinó que las cepas aisladas de pacientes son más sensibles, que las ATCC.

TABLA 8: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale* SOBRE DOS TIPOS DE CEPAS DE *Streptococcus mutans*.

Grupos	N	Media	Desviación Estándar	T	P
Actividad sobre cepa ATCC.	5	20,9	0,9	8,33	0,000*
Actividad sobre cepa aislada de paciente.	5	26,9	1,4	-	-

*P<0,05: Existe diferencias significativas según la prueba T de Student.

VI. DISCUSIÓN

El presente estudio se llevó a cabo sobre cepas de *Streptococcus mutans*, con el objetivo de comprobar la actividad del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre este microorganismo, principal inductor de la caries dental. Se evaluó la actividad sobre dos tipos de cepas de acuerdo a su origen o procedencia: una cepa aislada a partir de muestras de pacientes y otra adquirida de la colección ATCC. La actividad antibacteriana sobre este microorganismo está representada por la presencia de los halos de inhibición. Mientras mayor es el diámetro del halo de inhibición mejor es la actividad antibacteriana de la sustancia.

Para la extracción del Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* se utilizó como solvente el éter de Petróleo, tal como lo hicieron Pinto y col. (Colombia, 1999)⁵ en un estudio donde evaluaron la actividad antibacteriana del extracto crudo del aceite y la de cinco fracciones del mismo. En dicho estudio determinaron que existe mayor acción antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* a una determinada concentración (0,312 ug/mL) Sin embargo en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones. Para solubilizar el Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* y permitir su utilización en un medio acuoso sin afectar su actividad bactericida el diluyente empleado fue el propuesto por Garzón y col. (2002)³, al igual que nosotros utilizamos esta sustancia, en un estudio en el que comprobaron que el Hidróxido de Sodio al 0.1 N es la solución óptima; luego de demostrar que la acción antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*, del Aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* diluido con esta sustancia, fue superior a la reportada por la Clorhexidina 0,12 % luego de las primeras 144 horas, siempre en ausencia de alguna manifestación de toxicidad.

En el presente estudio el efecto antibacteriano del aceite alcanzó un rango de actividad entre 16 y 25 milímetros sobre las cepas ATCC, y un rango de 16 a 32 milímetros sobre las cepas obtenidas de muestras de pacientes; con medias de 20,9 y 26,9 respectivamente. La mayor actividad obtenida fue sobre una cepa aislada donde se registró un diámetro de 34 milímetros en el halo formado alrededor del Aceite al 100 %. Y la menor actividad se dio por parte del Aceite al 50 % sobre una cepa ATCC y al 60 % sobre una cepa aislada, donde se registraron halos de 16 y 15 milímetros respectivamente. Sin embargo estas diferencias no fueron significativas pues la acción se dio en todas las concentraciones y en ambos tipos de cepas.

Se demostró que cada una de las concentraciones del Aceite tiene actividad antibacteriana, y aunque no existe diferencia significativa entre ellas se aprecia que la relación entre el grado de concentración de las tres sustancias que contienen mayor cantidad de aceite y su actividad antibacteriana es directa. La mayor actividad se da por parte del Aceite al 100 %, con una media de 28.8 milímetros sobre cepa de pacientes y 23 milímetros sobre cepa ATCC, esto al tratarse del extracto puro, sin diluir. La actividad de los Aceite al 60 y 50 %, como se explicó, va disminuyendo en relación al grado de concentración, sin embargo los valores obtenidos en los Aceite al 40 y 30 % son mayores que los registrados por parte de las concentraciones al 50 y 60 %. Este aparente sesgo podría deberse a una mala manipulación del aceite al momento de la dilución, pero estadísticamente se demostró que no existe diferencia significativa entre la actividad de cada una de las concentraciones por lo que no podemos hacer diferencia entre las concentraciones del Aceite y su actividad sobre los *Streptococcus mutans*.

En oposición a lo descrito por Guatibonza (1999)⁶, quien determinó que la actividad antibacteriana en cada una de las fracciones obtenidas era distinta, se determinó que existe homogeneidad en la actividad de cada concentración para cada tipo de cepa, obteniéndose medias de 26,9 milímetros sobre cepas

aisladas de muestras de pacientes, y de 21,3 milímetros sobre cepas ATCC. Dicha homogeneidad en los resultados niegan nuestra hipótesis de que alguna de las sustancias posee mejor potencial antibacteriano.

Dicha diferencia que no se halló en la presente investigación, debería de presentarse tal vez si diluyéramos el aceite a menor concentración. La relación entre las concentraciones y la acción antibacteriana pudo deberse al genotipo del fruto, a la necesidad de evaluar al aceite en menor grado de concentración, a alguna alteración presente durante la extracción del aceite, durante la dilución del mismo, o al microorganismo estudiado. Aun así se resalta que cada concentración presentó actividad antibacteriana, aseverando la hipótesis planteada en nuestra investigación. Pinto y col. (1999)⁵ determinaron que la mayor acción antibacteriana se logró con la dilución del Aceite al 0,312 ug/mL.

Se observó que el control positivo (Clorhexidina 0,12 %) presenta actividad antibacteriana tanto en las cepas obtenidas de pacientes como en las adquiridas de la colección ATCC. Los resultados obtenidos demuestran su actividad antibacteriana, con formación de halos de inhibición que varían entre 16 y 21 milímetros, y una media de 19 milímetros sobre cepas aisladas de pacientes y de 21 milímetros sobre cepas ATCC.

Pinto (1999)⁵ y Garzón (2002)³ concluyeron que existe mejor actividad del aceite sobre *Streptococcus mutans*, en comparación con la acción de la Clorhexidina 0,12 %. Nuestra investigación corrobora estadísticamente estos resultados. Tras la comparación con la media de los resultados de las diferentes concentraciones y con la media de los aceites de mayor y menor grado de concentración, por separado, y los obtenidos por el control positivo se determinó que no poseen actividad homogénea en ninguno de los casos, en los tres casos existe diferencia significativa a favor de la actividad antibacteriana del aceite.

La comparación de la actividad antibacteriana del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre dos tipos de cepa de *Streptococcus mutans* dio como resultado que no tienen comportamiento homogéneo, y al ser mayor la actividad antibacteriana en las cepas aisladas de las muestras de pacientes, se concluye que la cepa ATCC fue más resistente al aceite que las cepas aislada de muestras de pacientes. Dicha sensibilidad se presenta probablemente debido a que las cepas de muestras de pacientes son retiradas de hábitat natural no habiendo tenido contacto previo con dichas sustancias.

A partir de los resultados obtenidos en nuestra investigación se ha podido constatar actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* por parte del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale*, tal como lo demostraron en diferentes estudios Guatibonza⁶ y Pinto⁵ (1999), Lima y col. (2000)¹⁷, Ferreira y col. (2005)¹⁴, y Pereira (2006)¹³, en sus respectivas investigaciones, ninguna llevada a cabo en nuestro país con respecto al *S. mutans*, aunque Tello (2010)⁸¹ demostró acción antibacteriana contra otros microorganismos como *S. aureus*, más no contra *C. albicans*.

VII. CONCLUSIONES

1. El aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* presentó en todas las concentraciones utilizadas de 100 %, 60 %, 50 %, 40 % y 30 % acción antibacteriana in vitro sobre *Streptococcus mutans*, tanto sobre cepas ATCC como en cepas aisladas de pacientes.
2. La actividad antibacteriana dada por el aceite puro fue ligeramente más efectiva, aunque no hubo diferencias significativas entre las diferentes concentraciones para ambos tipos de cepas estudiadas.
3. En base a las concentraciones y metodología utilizada no se pudo encontrar diferencias significativas en la acción antibacteriana del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* a las diversas concentraciones utilizadas sobre las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC y de procedencia clínica.
4. El aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* tuvo mejor actividad antibacteriana in vitro contra *Streptococcus mutans* que la Clorhexidina 0,12 %, tanto sobre las cepas ATCC como en cepas aisladas de muestras de pacientes.
5. Las cepas de procedencia clínica fueron estadísticamente más sensibles que las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC al aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale*.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Cragg G, Nexman D. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Investig.* 1999; 17(2): 153-63.
2. Medina R. Efecto de la temperatura de industrialización de la nuez de marañón en la actividad antibacteriana en *Streptococcus mutans* del líquido de la cáscara LCNM. *Rev Colombiana de Química.* 2003; 32(2): 103-112.
3. Garzón F, Flomin B, Jiménez B, Medina A. Efecto de la formación de sales de los componentes activos del líquido de la cáscara de la nuez del marañón (*Anacardium occidentale*) en la actividad antimicrobiana sobre el *Streptococcus mutans*. 2002. Trabajo de pregrado: Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia.
4. Gaitán S. Estabilidad química y antibacteriana en *Streptococcus mutans* del líquido de la cáscara de la nuez del marañón (*Anacardium occidentale*) calentando a temperaturas de industrialización de la almendra. 2000. Trabajo de pregrado Química: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Se puede encontrar en la Biblioteca de la Facultad.
5. Pinto M, Rodríguez M, Medina R. Prueba “*in vitro*” del LCNM *Anacardium occidentale* en el *Streptococcus mutans*. 1999. Trabajo de investigación, pre grado: Universidad Nacional de Colombia. Disponible en la Biblioteca de la Facultad de Odontología de la Universidad de Colombia.
6. Guatibonza S. Extracción del líquido de la cáscara de la nuez del marañón y determinación de la actividad antibacteriana en *Streptococcus mutans*. 1999. Trabajo de grado, pregrado Química: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
7. Moromi H. Manual de prácticas de microbiología general y estomatológica. 2004: 82-120. Perú, Lima.
8. Brook, I. Management and Prevention of Odontogenic Infections. *Meciscap Infectious Diseases.* 2003; 5(1).
9. Abello R, Barrientos S, Delgado J, Gonzales O, Jaramillo L, Martínez M, Rodríguez A. Generalidades sobre la caries dental. 2004 Feb. Disponible en: <http://www.encolombia.com/odontologia/investigaciones/caries.htm>

10. Liébana U. Microbiología Oral. Interamericana-Mc Graw-Hill. 1995. España, Madrid.
11. Locker D. Incidence and prevalence of caries in an older Canadian population. *Comm Dent Oral Epidemiol*. 1996; 24: 7-403.
12. González M, Ramirez D, Jacobo O. Antecedentes y situación reguladora de la medicina herbaria en Cuba. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2007 Abr. 13 (publicado: 2007 Jul. 19); 6(4): 118-124. Disponible en:
www.uv.es/~prietojm/BLACPMA/ArchivoSep/Gonzalez_BLACPMA_V6_N4.pdf
13. Pereira J, Sampaio F, Pereira M, Melo A, Higino J, Carvalho A. In vitro antimicrobial activity of an extract from *Anacardium occidentale* Linn on *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Rev. Odontol clin-cient*. 2006 Abr.-Jun.; 5(2): 137-141.
14. Ferreira C, Vieira M, Higino J, Vieira J, Branquinho A. Atividade antifúngica in vitro da casca do *Anacardium occidentale* Linn. Sobre leveduras do género *Cándida*. *Rev. Arquivos em Odontologia, Belo Horizonte*. 2005 Jul.-Set.; 41(3): 193-272.
15. Muroi H, Kubo I. Bactericidal activity of anacardic acids against *Streptococcus mutans* and their potentiation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1993; 41(10): 1780-1783.
16. Melo A, Diniz M, Santos H, Silva M, Medeiros I. Ensaios toxicológicos pré-clínicos agudos do extrato bruto da casca do caule de *Anacardium occidentale* Linn em Ratos. *Rev. Bras. Cienc. Saude*. 2004; 8(3): 217-222.
17. Lima C, Pastore G, Lima E. Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-anao-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturacao sobre microorganismos da cavidade bucal. *Rev. Cienc. Tecnol. Alimenta*. 2000 Sept.-Dec.; 20(3).
18. Cowan MM. Plant Products as antimicrobial agents. *Clin. Microbial Rev*. 1999; 19(4): 564-582.
19. Paolini M. Brussels sprouts: an exceptionally rich source of ambiguity for anticancer strategies. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998 Oct; 152(2): 293-4.

20. Ornish D, Brown S, Scherwite L, Billing J, Armstrong W, Portita A, et al. Can life style changes reverse coronary heart disease?. The Life Style Heart Trial. 1990; 336.
21. Romart X. Naturellement mieux. Therapeutiques Naturelles 1997; 129: 7-21.
22. Rodríguez I. ¿Por qué medicina alternativa?. Resumed 1997; 10(3): 99-102.
23. Oliveira M, Velásquez D, Bermúdez A. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. 2005; 30(8): 453-459.
24. Waizel-Bucay J. Martínez I. Plantas empleadas en odontalgias I. Medigraphic (serial de Internet). 2006 Jul. 10 (citado: 2007 Set.-Oct.); 64(5): 173-186. Disponible en:
<http://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2007/od075b.pdf>
25. Gordon J. Alternative medicine and the family physicians. Am Fam Phys 1996; 54(7): 12-2205.
26. Siani A, Franco A, de Sousa M, Oliveira M. Óleos esseciais Potencial anti-inflamatório. Biotecnologia Ciencia y Desarrollo. 1998; 16: 1-11.
27. Pardo O. Estudio comparativo de ocho especies americanas de uso medicinal en Mozambique. Estudio presentado en el VIII Congreso Ítalo-Latinoamericano de Etnomedicina: Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso; 1999 Set. 27-29; Valparaiso. 1999.
28. Chung K. Why alternative medicine? A Fam Physician. 1996; 54(7): 84-93.
29. Velak J, Stodola J. Prólogo. En: El gran libro de las plantas medicinales. 2a. ed. Praga: Sugesta, 1989: 340.
30. Laza D, Rodríguez I, Sardiña G. Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. Rev Cubana Plant Med. 2003 Set.-Dic.; 8(3).
31. Farnsworth N, Akerete O, Bengel A, Suejanto D, Guo Z. Las plantas medicinales en la terapéutica. Bol Of Sanit Panam 1989; 107(4): 29-4314.
32. Mc Knight I, Seatt M. Managing HIV 74 HI and complementary medicine. MJA 1996; 165(3):143-5.
33. Zang X. Traditional medicine Who. Hardard Medicus 1996; 39(3):103.

34. Mitchell S, Ahmad H. Un resumen de la investigación sobre plantas medicinales en la Universidad de West Indies, Jamaica, 1948-2001. *West Indian medical Journal*. 2006; 55(4): 243-269.
35. Phillipson J, Chan K, Hussin A, Sadikun A, Yuan K, Asmawi M, Ismail Z. Global trend and market size of herbal medicine in primary health care. *Trends in Traditional Medicine Research. Proceeding of the International Conference on the use of Traditional Medicine and other natural products in Health care*. En: Penang: Schoool of Pharmaceutical Sciences. University of Science. Malaysia, 1995:1-8.
36. Lancet X. Pharmaceuticals from plants: great potentials few funds. [editorial]. 1994; 343(8912):5-1513.
37. Lagarto A, Tillán J, Vega R, Cabrera Y. Toxicidad aguda oral de extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales. *Rev Cubana Plant Med*. 1999; 1(4): 26-8
38. Beyra A, León M, Iglesias E, Ferrándiz D, Herrera R, Volpato, y col. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 2004; 61(2): 185-204
39. Echemendía S. Medicina tradicional herbolaria, verde o fitoterapia. 2006. Disponible en:
<http://www.16deabril.sld.cu/apuntes/mnt>
40. Ruiz, M. Relación histórica de los viajes a los reinos del Perú y Chile, Tomo II. 1952. España, Madrid.
41. Weberbauer A. Génesis de la flora Peruana. Ed. Lumen. 1956. Perú, Lima.
42. León F, Cabieses F. Efecto antiinflamatorio de la *Uncaria tomentosa*. *Odontología Sanmarquina*. 2000; 1(6): 66-68.
43. Lahoud V, Gutiérrez J, Romero M, Ortiz E. Análisis histológico del recubrimiento pulpar directo con pasta a base de *Uncaria tomentosa*. *Odontología Sanmarquina*. 2000 Jun.; 1(5): 9-14.
44. Lahoud V, Gutiérrez J, Mendoza J, Cisneros L. Ventajas terapéuticas del uso de la asociación de ampicüina con *uncaria tomentosa* en pacientes con procesos infecciosos agudos en la cavidad oral. *Odontología Sanmarquina*. 2001 Jul.-Dic.; 1(8): 7-12.

45. Durand A. La sangre de grado y la odontología. *Visión Dental*. 1997; 1(1): 22.
46. Trujillo F. Estudio clínico de los efectos del bálsamo del Perú en el tratamiento de alveolitis seca dolorosa. Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista UPCH. 1983. Perú, Lima.
47. Villalobos O, Salazar C, Ramírez G. Efecto de un enjuague bucal compuesto de *aloe vera* en placa bacteriana e inflamación gingival. *Acta odontológica venezolana*. 2001; 39 (2): 16-24.
48. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. App Microbiol*. 1998; 26: 118-122.
49. Food Agriculture Organization - Roma. Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492. 1992. (Editado por Hernández B y León J.).
50. Mendez Ferrao J. A aventura das plantas e dos descobrimentos portugueses. Ed. Instituto de Investigaçao Cientifica Tropical. 1998.
51. Vit P. *Anacardium occidentale* L: ficha botánica de interés apícola en Venezuela, N.º6 Merey. *Rev.Fac.Farm*. 2003 Ene.-Jun.; 45(1): 77-79.
52. Arce G, Sánchez L, Slaa J, Sánchez-Vindas P, Ortiz A, van Veen J, Sommeijer M. Árboles Melíferos Nativos de Mesoamérica. Herbario Juvenal Valerio Rodríguez. 2001; 208. Costa Rica, Heredia.
53. McLaughlin J, Balerdi C, Crane J. Marañón-*Anacardium occidentale* L. *Species Plantarum*. 2005; 1: 383.
54. Ogulana y Ramstad citados en: House P, Lagos-Witte S, Ochoa L, Torres C, Mejía T, Rivas M. Plantas medicinales comunes de Honduras. 1995. Honduras, Tegucigalpa.
55. Jansen P, Méndez O. Plantas medicinales: seu uso tradicional em Moçambique, 4 tomos. Ed. Gabinete de Estudos de Medicina Tradicional. (GEMT). 1990.
56. Kadiri S, Arije A, Salako B. Traditional herbal preparations and acute renal failure in South West Nigeria. *Tropical*. 1999; (4): 244-246.
57. Prabha S, Rajamohan T. Effect of inclusion of cashew globulin (*Anacardium occidentale*) to a casein diet on lipid parameters in rats. *Plant Foods for Human Nutrition*. 1998; 53(1): 83-92.

58. Leszczynska J, Kucharska U, Zegota H. Aflatoxins in nuts assayed by immunological methods. *European Food Research and Technology*. 2000; 210(3): 213-215.
59. Wang F, Robotham J, Teuber S, Tawde P, Sathe S, Roux K. Cashew (*Anacardium occidentale*) allergen of the vicilin seed storage protein family. *Journal of Allergy and Clinical*. 2002; 110(1): 160-166.
60. Hoyos, J. Flora de la isla de Margarita, Venezuela. Sociedad y Fundación La Salle de Ciencias Naturales. Monografía No. 34. 1985; 927. Venezuela, Caracas.
61. Menezes E, Tome E, Nunes R, Nunes A, Freire C, Torres J, Castro F, Croce J. Extracts of *Anacardium occidentale* (cashew) pollen in patients with allergic bronchial asthma. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*. 2002; 12(1): 25-28.
62. Folster-Holst R, Hausen B, Brasch J, Christophers E. Allergic contact dermatitis caused by poison ivy. (*Hautarzt*. 2001; 52(2): 136-142.
63. Muroi H, Kubol I. Bactericidal activity of Anacardic Acids against *S. mutans* and their Potentiation. *J. Agric. Food Chem*. 1993; 39: 418-421.
64. Blazdell P. The mighty cashew. *Interdisciplinary Science Reviews*. 2000; 25(3): 220-226.
65. Kubo J, Lee J, Kubo I. Anti-Helicobacter pylori agents from the cashew apple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999; 47(2): 533-537.
66. Medina R. Efecto de la temperatura de industrialización de la nuez de marañón en la actividad antibacteriana en *Streptococcus mutans* del líquido de la cáscara (LCNM). *Rev. Colombiana de Química*. 2003; 32(1): 103-112.
67. Gabinete de Estudios de Medicina Tradicional. Medicina tradicional: algunos resultados preliminares do trabalho do gabinete de estudos de medicina tradicional (GEMT). 1981; Cuadernos de Saúde 1.^a Serie(1).
68. Pinto M, Rodríguez M, Medina R. Prueba “*in vitro*” del líquido de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* en el *Streptococcus mutans*. Trabajo de grado Odontología. 1999. Universidad Nacional de Colombia.
69. Negroni M. Microbiología estomatológica. Ed. Médica Panamericana. 1999: 203-215. Argentina, Buenos Aires.

70. Irigoyen M, Zepeda A, Sánchez L. Prevalencia e incidencia de caries dental y hábitos de higiene bucal en un grupo de escolares del Sur de la Ciudad de México. *Revista ADM*. 2001; 53(3): 98-104.
71. Närhi T, Vehkalahti M, Siukosaari A. Salivary findings, daily medication and caries in the old elderly. *Caries Res*. 1998; 32: 5-9.
72. Liébana U. *Microbiología Oral*; Primera edición. Mc Graw-Hill. Interamericana. 1995. 448-492. España, Madrid.
73. Liébana U. *Microbiología Oral*; Primera edición. Mc Graw Hill. Interamericana. 1997; 448-492. España.
74. Kukleva M, Kondeva V. A study on the prevalence of caries incipiens in 7-14 years old children from Plovdiv. *Folia Med*. 1998; 40(4): 541.
75. Pettis T, Satto R, Ottolenghil T, Simonetti D. Su tre different, metodiche d; valutazione dello *S. mutans* nella Saliva. *Minerva Stomol*. 1994; 43(3): 98-101.
76. Larmas M. Saliva and dental caries: diagnostic tests for normal dent practice. *Int Dent J* 1992; 42: 199-208.
77. Erickson P. Estimation of the caries-related risk associated with formula. *Pediatr Dent*. 1998; 20(7): 395-403.
78. Dutra G. Cárie dentária uma doença transmissível. *Rev Bras Odontol*. 1997; 54(5): 6-293.
79. Ikeda T, Sandham H, Bradley E. Change in *Streptococcus mutans* and *lactobacilli* plaque in relation to the initiation of dental caries in negro children. *Arch Oral Biol*. 1973; 18: 555-556.
80. Nicho A, Marquez A, Davila J, Moromi H, Marín G. Aislamiento y estudio de los estreptococos de la placa bacteriana dental. *Selecciones Odontológicas* 1981; 5 y 6:36-39
81. Tello J. Acción antimicrobiana de *Anacardium occidentale* sobre *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* estudio *in vitro* 2010 .Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú.

IX. ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Título del Protocolo: Recolección de muestras de placa dental.

Investigador: Carlos José Ponce Contreras

Sede donde se realizará el estudio: Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la UNMSN.

Nombre del paciente (opcional): _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación odontológica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1. OBJETIVO DEL ESTUDIO:

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo principal determinar la actividad antibacteriana del aceite de la cáscara de un fruto que crece en la selva de Perú (el *Anacardium occidentale*) sobre el principal microorganismo presente en el inicio de la caries dental (*Streptococcus mutans*)

2. BENEFICIOS DEL ESTUDIO:

En estudios realizados anteriormente por otros investigadores se ha observado que existe actividad a favor de nuestro aceite, y queremos demostrar

Con este estudio conocerá de manera clara si

Esta investigación colaborará para que en un futuro el aceite estudiado pueda ser aplicado directamente sobre el paciente, de modo que se prevenga o sea útil en el tratamiento de caries que empieza a formarse.

3. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO:

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizará la toma de muestra de placa dental, la próxima vez que acuda a la Clínica Odontológica, dos horas después de haber ingerido el primer alimento del día, y minutos después de haberse enjuagado con agua potable. Se le pide por favor que no deberá de realizarse algún tipo de limpieza bucal un día antes de la toma de muestra.

Para la obtención de la muestra de placa se le realizará un aislamiento relativo con torundas de algodón estériles, se secará la pieza elegida con aire proveniente de la jeringa triple del módulo dental, y se procederá a la toma de muestra con un instrumental estéril.

4. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO: Ninguno.

5. ACLARACIONES:

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
 - No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
 - No recibirá pago por su participación.
 - En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
 - La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad.
 - En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.
 - Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

6. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Recibiré una copia firmada y fechada de este consentimiento.

Firma del participante

Fecha:

He explicado a _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apegó a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha:

RECOLECCIÓN DE DATOS

MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* AISLADAS DE MUESTRAS DE PACIENTES.*

Muestra N.º 1 sobre cepa de muestra de paciente	
Sustancia	Halo de inhibición
30 %	18 milímetros.
40 %	19 milímetros.
50 %	16 milímetros.
60 %	16 milímetros.
100 %	19 milímetros.
Control +	21 milímetros.
Control -	No registrable.

Muestra N.º 2 sobre cepa de muestra de paciente	
Sustancia	Halo de inhibición
30 %	20 milímetros.
40 %	20 milímetros.
50 %	18 milímetros.
60 %	15 milímetros.
100 %	24 milímetros.
Control +	21 milímetros.
Control -	No registrable.

Muestra N.º 3 sobre cepa de muestra de paciente	
Sustancia	Halo de inhibición
30 %	30 milímetros.
40 %	30 milímetros.
50 %	30 milímetros.
60 %	24 milímetros.
100 %	30 milímetros.
Control +	17 milímetros.
Control -	No registrable.

Muestra N.º 4 sobre cepa de muestra de paciente	
Sustancia	Halo de inhibición
30 %	30 milímetros.
40 %	30 milímetros.
50 %	24 milímetros.
60 %	30 milímetros.
100 %	33 milímetros.
Control +	21 milímetros.
Control -	No registrable.

Muestra N.º 5 sobre cepa de muestra de paciente	
Sustancia	Halo de inhibición
30 %	30 milímetros.
40 %	28 milímetros.
50 %	30 milímetros.
60 %	32 milímetros.
100 %	34 milímetros.
Control +	20 milímetros.
Control -	No registrable.

Muestra N.º 6 sobre cepa de muestra de paciente	
Sustancia	Halo de inhibición
30 %	30 milímetros.
40 %	30 milímetros.
50 %	28 milímetros.
60 %	30 milímetros.
100 %	31 milímetros.
Control +	16 milímetros.
Control -	No registrable.

Muestra N.º 7 sobre cepa de muestra de paciente	
Sustancia	Halo de inhibición
30 %	32 milímetros.
40 %	30 milímetros.
50 %	30 milímetros.
60 %	30 milímetros.
100 %	30 milímetros.
Control +	18 milímetros.
Control -	No registrable.

Muestra N.º 8 sobre cepa de muestra de paciente	
Sustancia	Halo de inhibición
30 %	30 milímetros.
40 %	28 milímetros.
50 %	28 milímetros.
60 %	30 milímetros.
100 %	30 milímetros.
Control +	18 milímetros.
Control -	No registrable.

*** Las medidas que figuran son los promedios de las medidas de las cepas iniciales con las de su replicación.**

MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* OBTENIDAS DE LA COLECCIÓN ATCC 25175.*

Muestra N.º 1 sobre cepa ATCC 25175	
Sustancia	Halo de inhibición
30 %	20 milímetros.
40 %	19 milímetros.
50 %	16 milímetros.
60 %	17 milímetros.
100 %	21 milímetros.
Control +	21 milímetros.
Control -	No registrable.

Muestra N.º 2 sobre cepa ATCC 25175	
Sustancia	Halo de inhibición
30 %	22 milímetros.
40 %	25 milímetros.
50 %	23 milímetros.
60 %	25 milímetros.
100 %	25 milímetros.
Control +	21 milímetros.
Control -	No registrable.

Muestra N.º 3 sobre cepa ATCC 25175	
Sustancia	Halo de inhibición
30 %	20 milímetros.
40 %	19 milímetros.
50 %	16 milímetros.
60 %	17 milímetros.
100 %	21 milímetros.
Control +	21 milímetros.
Control -	No registrable.

Muestra N.º 4 sobre cepa ATCC 25175	
Sustancia	Halo de inhibición
30 %	22 milímetros.
40 %	25 milímetros.
50 %	23 milímetros.
60 %	25 milímetros.
100 %	25 milímetros.
Control +	21 milímetros.
Control -	No registrable.

*** Las medidas que figuran son los promedios de las medidas de las cepas iniciales con las de su replicación.**

RECOLECCIÓN DE LA NUEZ



LAVADO



SECADO Y MOLINADO



SECADO EN ESTUFA



SEPARACIÓN DE LA CÁSCARA Y LA NUEZ



CÁSCARA DE LA NUEZ



PULVERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale*



PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale*

EQUIPOS SOXHLET



MATERIALES Y MUESTRA DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ



PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale*



ACEITE EXTRAIDO DE LA CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale*



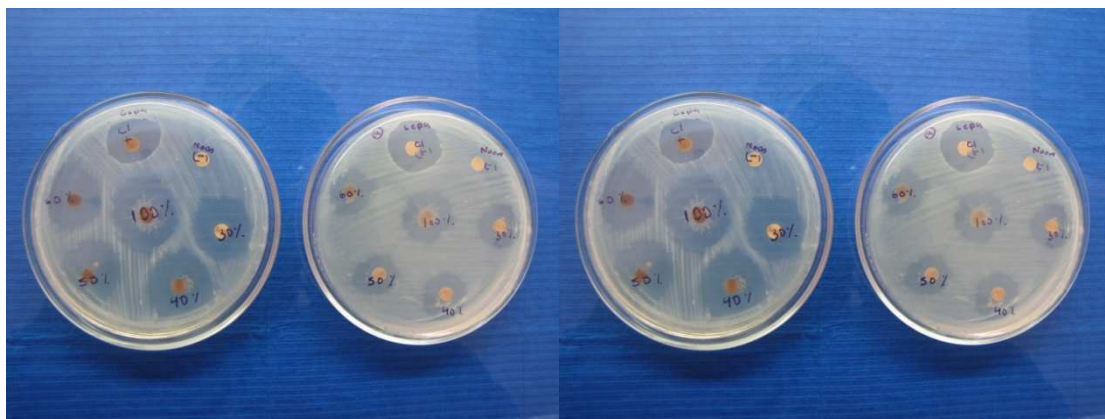
**CÁSCARA DE LA NUEZ DEL *Anacardium occidentale*, LUEGO DE
REALIZADO EL PROCESO DE EXTRACCIÓN**



INCUBACIÓN DE PLACAS PETRI



LECTURA DE RESULTADOS (CEPA ATCC)



LECTURA DE RESULTADOS (CEPAS AISLADAS DE PACIENTES)

